

▼B**PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ ET
DES AUTRES EFFETS SUR LA SANTÉ**

TABLE DES MATIÈRES

	INTRODUCTION GÉNÉRALE
B.1 bis.	TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA DOSE PRÉDÉTERMINÉE
B.1 ter.	TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË
B.2.	TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION
B.3.	TOXICITÉ AIGUË (CUTANÉE)
B.4.	TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION CUTANÉE
B.5.	TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION OCULAIRE
B.6.	SENSIBILISATION CUTANÉE
B.7.	ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS
B.8.	TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS
B.9.	TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)
B.10.	MUTAGÉNÉCITÉ — ESSAI IN VITRO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE
B.11.	MUTAGÉNÉCITÉ — ESSAI IN VIVO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRE
B.12.	MUTAGÉNÉCITÉ — ESSAI IN VIVO DU MICRONOYAU SUR ÉRYTHROCYTES DE MAMMIFÈRE
B.13/14.	MUTAGÉNÉCITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES
B.15.	TESTS DE MUTAGENÈSE ET DE DÉPISTAGE DE CANCÉROGÈNESE MUTATION GÉNIQUE — <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>
B.16.	RECOMBINAISON MITOTIQUE — <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>
B.17.	MUTAGÉNÉCITÉ — ESSAI IN VITRO DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE
B.18.	LÉSION ET RÉPARATION D'ADN — SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) — CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO
B.19.	ESSAI IN VITRO D'ÉCHANGE DE CHROMATIDES-SŒURS
B.20.	TEST DE LÉTALITÉ RÉCESSIVE LIÉE AU SEXE SUR <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>

▼B

- B.21. TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO
- B.22. TEST DE LÉTALITÉ DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR
- B.23. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRE
- B.24. SPOT TEST CHEZ LA SOURIS
- B.25. TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS
- B.26. ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE — TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — RONGEURS: 90 JOURS
- B.27. ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE — TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — NON-RONGEURS: 90 JOURS
- B.28. TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE — ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS
- B.29. TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS
- B.30. ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE
- B.31. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ POUR LE DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL
- B.32. ÉTUDES DE CANCÉROGÈNE
- B.33. ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGÈNE
- B.34. TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION
- B.35. ÉTUDE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS
- B.36. TOXICOCINÉTIQUE
- B.37. NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË
- B.38. NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES — ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS
- B.39. ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE
- B.40. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI DE RÉSISTANCE ÉLECTRIQUE TRANSCUTANÉE (RET)
- B.40 bis. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE

▼B

- B.41. ESSAI DE PHOTOTOXICITÉ IN VITRO 3T3 NRU
- B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES
- B.43. ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CHEZ LES RONGEURS
- B.44. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VIVO
- B.45. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VITRO
- B.46. IRRITATION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ
- B.47. MÉTHODE D'ESSAI D'OPACITÉ ET DE PERMÉABILITÉ DE LA CORNÉE BOVINE POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL
- B.48. MÉTHODE D'ESSAI SUR ŒIL DE POULET ISOLÉ POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL
- B.49. ESSAI IN VITRO DE MICRONOYAUX SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES
- B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA
- B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA

▼M4

- B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

▼M5

- B.53. ÉTUDE DE NEUROTOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT
- B.54. BIOESSAI UTÉROTROPHIQUE CHEZ LES RONGEURS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DES PROPRIÉTÉS ŒSTROGÉNIQUES
- B.55. BIOESSAI DE HERSHBERGER SUR LE RAT: ESSAI DE DEPISTAGE A COURT TERME DE PROPRIETES (ANTI)ANDROGENIQUES
- B.56. ÉTUDE ETENDUE DE TOXICITE POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GENERATION
- B.57. ESSAI DE STEROÏDOGENESE H295R
- B.58. ESSAIS DE MUTATIONS GÉNÉTIQUES DES CELLULES SOMATIQUES ET GERMINALES DE RONGEURS TRANSGÉNIQUES

▼B**INTRODUCTION GÉNÉRALE****A. CARACTÉRISATION DE LA SUBSTANCE À TESTER**

Avant d'entreprendre toute étude de toxicité, il faut connaître la composition de la substance à tester, y compris les principales impuretés, ainsi que ses propriétés physico-chimiques dont sa stabilité.

Les propriétés physico-chimiques de la substance fournissent des informations importantes pour le choix de la voie d'administration, pour la conception des différentes études, ainsi que pour la manipulation et le stockage de la substance.

La mise au point d'une méthode d'analyse permettant une évaluation qualitative et quantitative de la substance à tester (y compris, si possible, de ses principales impuretés) dans le véhicule d'administration et dans le matériel biologique doit précéder la mise en œuvre de l'étude.

Toutes les informations concernant l'identification, les propriétés physico-chimiques, la pureté et le comportement de la substance à tester doivent être consignées dans le procès-verbal d'essai.

B. SOIN DES ANIMAUX

Lors des essais de toxicité, il est essentiel de procéder à des contrôles stricts des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques appropriées de soin des animaux.

i) Conditions d'hébergement

Les conditions ambiantes dans les locaux ou enceintes réservés aux animaux d'expérience doivent être adaptées à l'espèce utilisée pour l'essai. Pour les rats, les souris et les cobayes, la température ambiante doit être de $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins, la température doit être de $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ et l'humidité relative de 30 à 70 %.

Certaines techniques expérimentales sont particulièrement sensibles aux effets thermiques et, dans de tels cas, des indications précises concernant les conditions adéquates figurent dans la description de la méthode d'essai. Dans tous les essais de toxicité, la température et l'humidité doivent être contrôlées et consignées, et doivent figurer dans le rapport final d'étude.

Un éclairage artificiel doit garantir l'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les détails concernant les conditions d'éclairage doivent être consignés dans le rapport final d'étude.

Sauf si la méthode prévoit d'autres conditions, les animaux doivent être hébergés individuellement ou mis en cage par petits groupes de même sexe. Les cages collectives ne doivent pas contenir plus de cinq animaux.

Il est important que les comptes rendus d'expérimentation animale précisent le type de cage utilisé et le nombre d'animaux par cage lors de l'exposition à la substance chimique et pendant toute période d'observation qui suit.

▼Bii) *Conditions d'alimentation*

Le régime alimentaire doit répondre à tous les besoins nutritionnels de l'espèce soumise à l'expérience. Lorsque les substances à tester sont administrées dans la nourriture, il se peut que la valeur nutritionnelle de cette dernière soit amoindrie par une interaction entre la substance et un ingrédient de l'alimentation. Cette éventualité doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai. Les régimes alimentaires classiquement utilisés en laboratoire sont acceptables, l'eau de boisson étant fournie à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être guidé par la nécessité de garantir une proportion appropriée de substance en cas d'administration par cette méthode.

Les contaminants alimentaires qui agissent sur la toxicité ne doivent pas être présents à des concentrations susceptibles d'influencer les résultats.

C. MÉTHODES ALTERNATIVES

L'UE attache une grande importance à la mise au point et à la validation de méthodes alternatives qui fournissent autant d'informations que les expérimentations animales actuelles, mais qui nécessitent moins d'animaux, minimisent leurs souffrances et permettent d'éviter leur sacrifice.

Dès que de telles méthodes sont disponibles, elles doivent être envisagées, chaque fois que cela est possible, pour la caractérisation des dangers et pour la classification et l'étiquetage des substances en fonction des dangers intrinsèques.

D. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

L'extrapolation directe à l'homme des résultats des expériences sur les animaux et des essais *in vitro* n'est possible que dans certaines limites; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais; aussi, lorsque des effets indésirables ont été mis en évidence chez l'homme, ces données peuvent être utilisées pour confirmer les résultats expérimentaux.

E. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

La plupart des méthodes présentées ici sont élaborées dans le cadre du programme de lignes directrices de l'OCDE en matière d'essais. Ces méthodes doivent être mises en œuvre conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, afin de garantir l'acceptation mutuelle des données.

De plus amples informations peuvent être obtenues dans les références citées dans les lignes directrices de l'OCDE et dans d'autres publications pertinentes.

▼B**B.1 bis. TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA DOSE PRÉDÉTERMINÉE****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 420 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes traditionnelles pour évaluer la toxicité aiguë utilisent comme effet observé la mort des animaux. En 1984, la British Toxicology Society (BTS) a proposé une nouvelle approche pour les essais de toxicité aiguë, utilisant des doses prédéterminées (1). Cette méthode évitait d'utiliser la mort des animaux comme effet observé et s'appuyait plutôt sur l'observation de signes manifestes de toxicité apparaissant après traitement à une dose prédéterminée. À la suite des études de validation in vivo au Royaume-Uni (2) et au niveau international (3), cette procédure a été adoptée comme ligne directrice en 1992. Après cela, les propriétés statistiques de la méthode de la dose prédéterminée ont été évaluées dans une série d'études utilisant des modèles mathématiques (4) (5) (6). Ensemble, les études in vivo et celles fondées sur des modèles mathématiques ont démontré que la procédure était reproductible et utilisait moins d'animaux auxquels elle occasionnait moins de souffrance que les méthodes traditionnelles. Elle permet de classer les substances par ordre de toxicité, de la même manière que les autres méthodes d'essai de toxicité aiguë.

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (7). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 bis.

La méthode de la dose prédéterminée a comme principe de n'utiliser, pour l'étude principale, que des doses modérément toxiques et d'éviter d'administrer des doses qui peuvent s'avérer létales. De même, il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider d'euthanasier les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste, ainsi que les orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente, font l'objet d'un autre document d'orientation (8).

La méthode fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement des substances selon le système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (9).

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

▼B

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Toxicité orale aiguë: effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

Toxicité manifeste: terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai [voir (3)]. Ces signes doivent être tels que l'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de douleurs importantes et des signes persistants de détresse profonde, un état moribond [pour les critères, voir (8)] et probablement de la mortalité pour la plupart des animaux.

SGH: système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du BIT (communication des dangers) et coordonnée par l'IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente: il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Les signes indicatifs de cet état chez les rongeurs comprennent les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [voir (8) pour plus de détails].

DL₅₀ (dose létale 50 %): dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL₅₀ est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond: désigne l'état précédant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails, voir (8)].

Mort prévisible: présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails, voir (8)].

▼B

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des groupes d'animaux du même sexe reçoivent des doses prédéterminées de 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg selon une procédure séquentielle. Exceptionnellement, une dose additionnelle de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir section 1.6.2). La dose initiale, choisie sur la base d'une étude d'orientation, est celle qui est susceptible de faire apparaître certains signes de toxicité, sans toutefois provoquer des effets toxiques graves ou la mort. Les manifestations cliniques et les effets associés à la douleur, à la souffrance et à une mort imminente sont décrits dans un document d'orientation de l'OCDE (8). D'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou moins fortes en fonction de l'absence ou de la présence d'effets toxiques ou de mortalité. On continue la procédure jusqu'à ce que l'on identifie la dose qui occasionne un effet toxique évident ou la mort d'un seul animal. La procédure est également interrompue lorsque la dose la plus forte ne donne lieu à aucun effet observé ou lorsque la mort survient à la dose la plus faible.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (7). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (10). Si, toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être maintenue à 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

1.4.3. **Préparation des animaux**

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

▼B**1.4.4. Préparation des doses**

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide qui peut être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration, sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5. MODE OPÉRATOIRE**1.5.1. Administration des doses**

La substance d'essai est administrée en une seule dose par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou de toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2. Étude d'orientation

Le but de l'étude d'orientation est de permettre la sélection d'une dose initiale appropriée pour l'étude principale. L'administration des doses se fait de façon séquentielle aux animaux individuellement selon les schémas de l'annexe 1. L'étude d'orientation prend fin lorsqu'une décision au sujet de la dose initiale de l'étude principale peut être prise (ou lorsqu'une mortalité est observée à la dose prédéterminée la plus faible).

Pour la dose initiale de l'étude d'orientation, on choisit un niveau parmi les suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer des signes de toxicité évidente, si possible sur la base d'indications obtenues à partir de données in vivo et in vitro sur la même substance et sur des substances structurellement voisines. En l'absence de telles informations, la dose initiale sera de 300 mg/kg.

Les animaux sont traités à 24 heures d'intervalle au moins. Tous les animaux sont observés pendant au moins quatorze jours.

▼B

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire à une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir annexe 3). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

Dans le cas où un animal ayant reçu la dose prédéterminée la plus faible (5 mg/kg) mourrait au cours de l'étude d'orientation, la procédure normale est de terminer l'étude et de classer la substance en catégorie 1 du SGH (voir l'annexe 1). Cependant, il peut s'avérer nécessaire de confirmer la classification, et la procédure facultative supplémentaire ci-après est alors proposée. Un deuxième animal reçoit une dose de 5 mg/kg. Si ce deuxième animal meurt, la classification en catégorie 1 du SGH est confirmée et l'étude prend fin immédiatement. Si le deuxième animal survit, un maximum de trois animaux supplémentaires reçoivent chacun 5 mg/kg. Étant donné le risque de mortalité élevé, il convient de procéder de manière séquentielle par souci de protection des animaux. L'intervalle de temps entre chaque administration doit être suffisant afin de pouvoir démontrer que l'animal précédent a des chances de survivre. Si un deuxième animal meurt, l'administration séquentielle sera immédiatement arrêtée et aucun autre animal ne recevra de dose. Avec la mort d'un deuxième animal (indépendamment du nombre d'animaux soumis à l'essai au moment où celui-ci est arrêté), le résultat est A (2 morts ou plus), et la règle de classification présentée à l'annexe 2 pour la dose prédéterminée de 5 mg/kg s'applique: catégorie 1 s'il y a 2 morts ou plus, et catégorie 2 s'il y a seulement 1 mort. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

1.5.3. Étude principale

1.5.3.1. Nombre d'animaux et niveaux des doses

Les schémas de l'annexe 2 indiquent la marche à suivre après administration de la dose initiale. Il y a trois possibilités: arrêter l'essai et attribuer la classification appropriée, administrer la dose prédéterminée supérieure ou administrer la dose inférieure. Cependant, par souci de protection des animaux, les doses ayant entraîné la mort au cours de l'étude d'orientation ne sont pas réappliquées lors de l'étude principale (voir annexe 2). L'expérience démontre que le résultat le plus probable à la dose initiale est que la substance pourra être classée et qu'il sera inutile de prolonger l'essai.

En général, on utilise au total cinq animaux du même sexe à chaque niveau de dose étudié. Ce groupe de cinq animaux est constitué de l'animal utilisé dans l'étude d'orientation, auquel est administrée la dose sélectionnée, et de quatre animaux supplémentaires (sauf dans les rares cas où une dose utilisée dans l'étude principale n'a pas été utilisée dans l'étude d'orientation).

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce que l'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre. Un laps de temps de 3 ou 4 jours entre les administrations à chaque niveau de dose est recommandé, si nécessaire, pour permettre l'observation de signes de toxicité différée. Cet intervalle peut être ajusté selon qu'il convient, par exemple, en cas de réponse peu concluante.

▼B

Lorsque l'on envisage d'utiliser une dose prédéterminée maximale de 5 000 mg/kg, il y a lieu de suivre la procédure présentée à l'annexe 3 (voir également section 1.6.2).

1.5.3.2. Essai limite

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité ne se manifeste qu'au-delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Selon la procédure normale, une étude d'orientation à la dose initiale de 2 000 mg/kg (exceptionnellement 5 000 mg/kg), suivie du traitement de quatre animaux supplémentaires à cette même dose, sert d'essai limite dans cette ligne directrice.

1.6. OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée si nécessaire. Les moments où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent sont importants, surtout si les effets toxiques ont tendance à être différés (11). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somatomotrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (8). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1. Poids corporel

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

▼B**1.6.2. Pathologie**

Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus après administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. RÉSULTATS

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. RAPPORT**3.1. RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation),
- données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée,
- état microbiologique des animaux, s'il est connu,
- nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles),
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

- détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré,
- détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau),
- justification du choix de la dose initiale.

▼B

Résultats:

- tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité, nature, gravité et durée des effets),
- tableau des poids corporels et des variations du poids,
- poids individuel des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, et au moment de la mort ou du sacrifice,
- date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice,
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle,
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4.

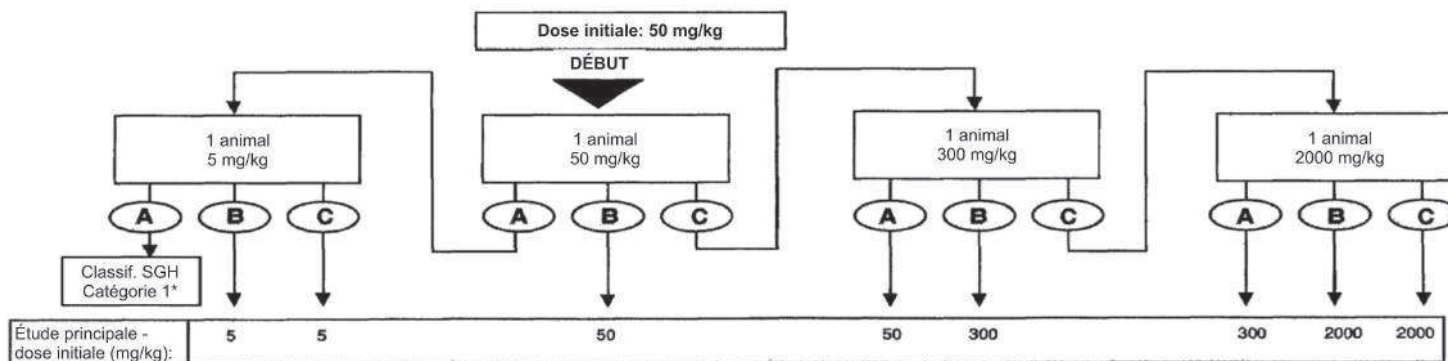
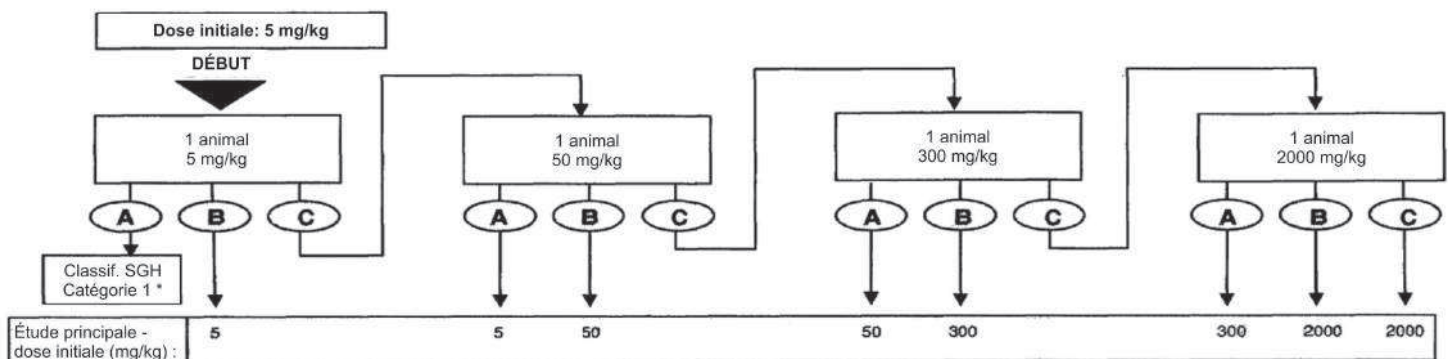
BIBLIOGRAPHIE

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, p. 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, p. 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, p. 469-482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, p. 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323. *Human Exptl. Toxicol.*
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, p. 183-196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

▼B

- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L, Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, p. 223-231.
- (11) Chan, P.K and A.W. Hayes (1994). Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation in: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

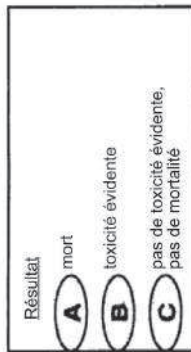
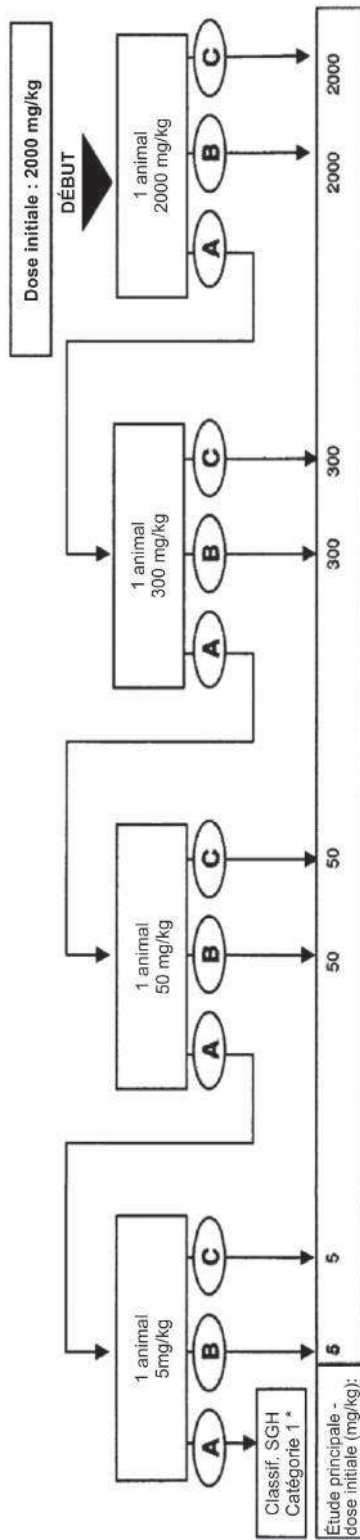
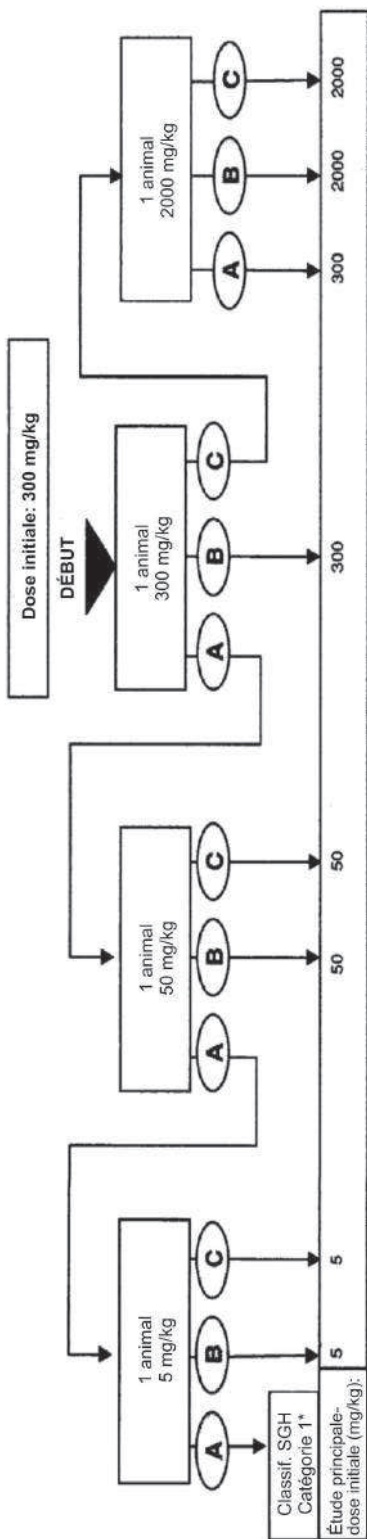
SCHÉMA POUR L'ÉTUDE D'ORIENTATION



Résultat	
(A)	mort
(B)	toxicité évidente
(C)	pas de toxicité/pas de mortalité

* pour le résultat **(A)** à 5 mg/kg, il y a une étape supplémentaire facultative pour confirmer la classification SGH: voir section 1.5.2.

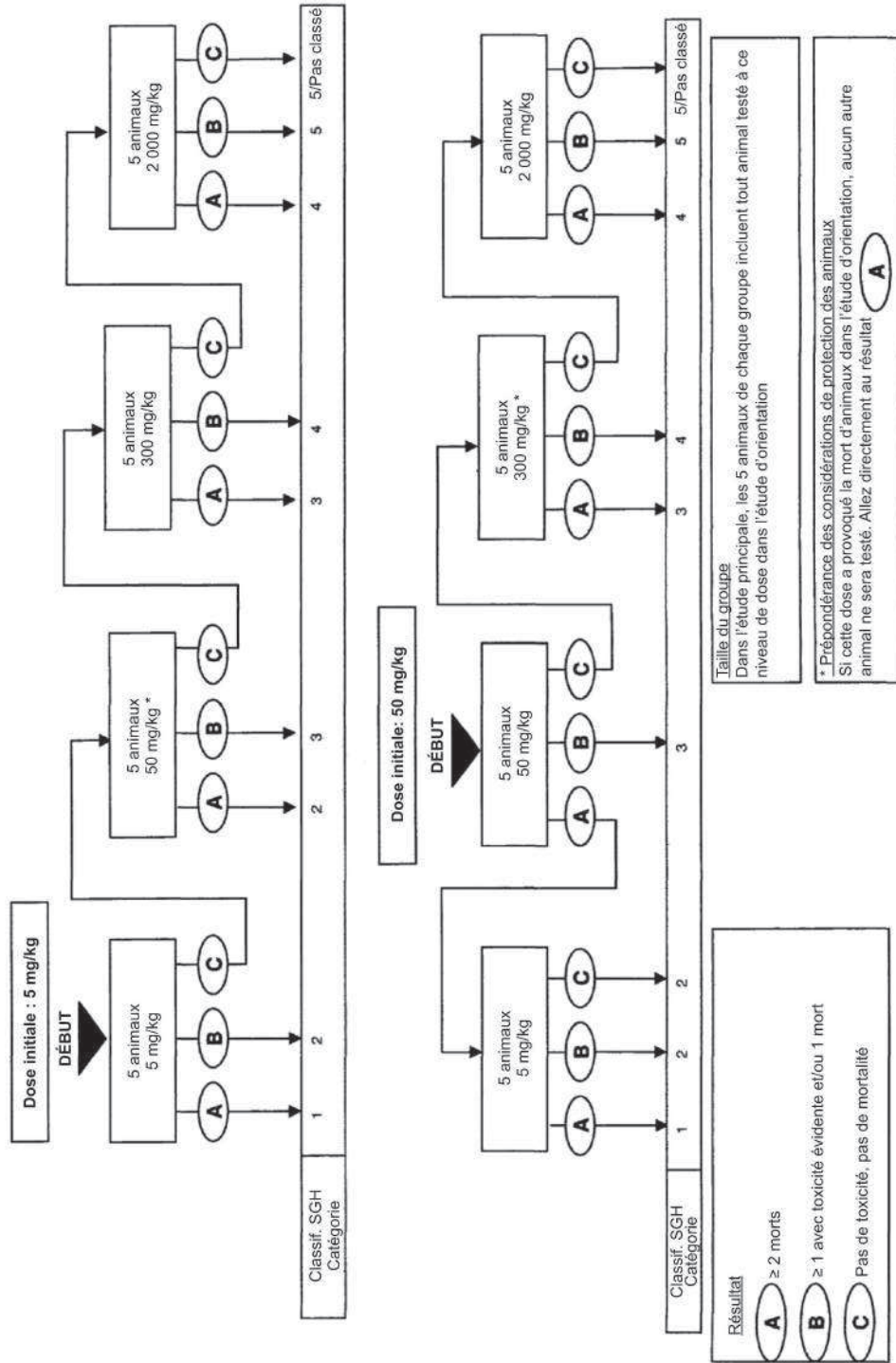
▼B

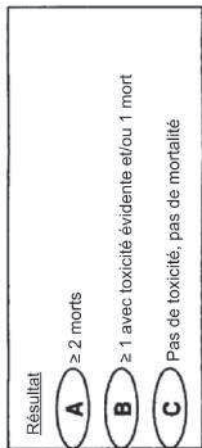
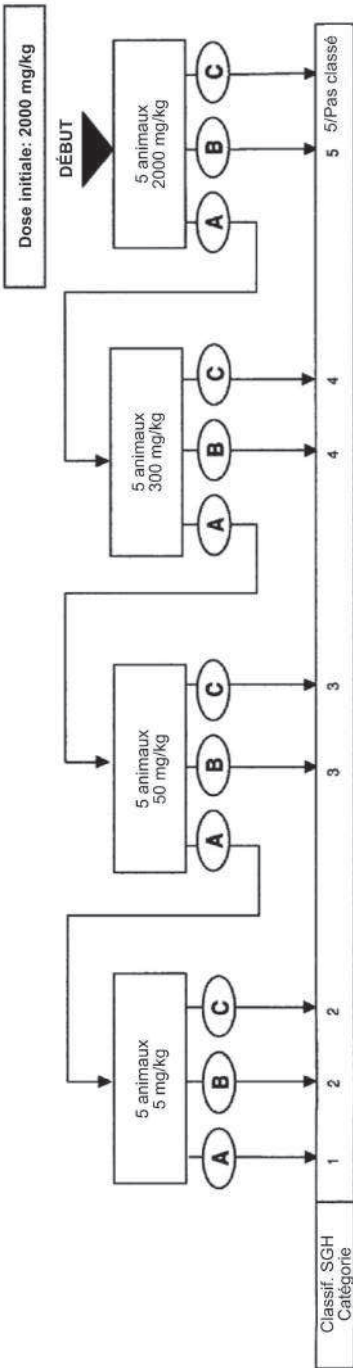
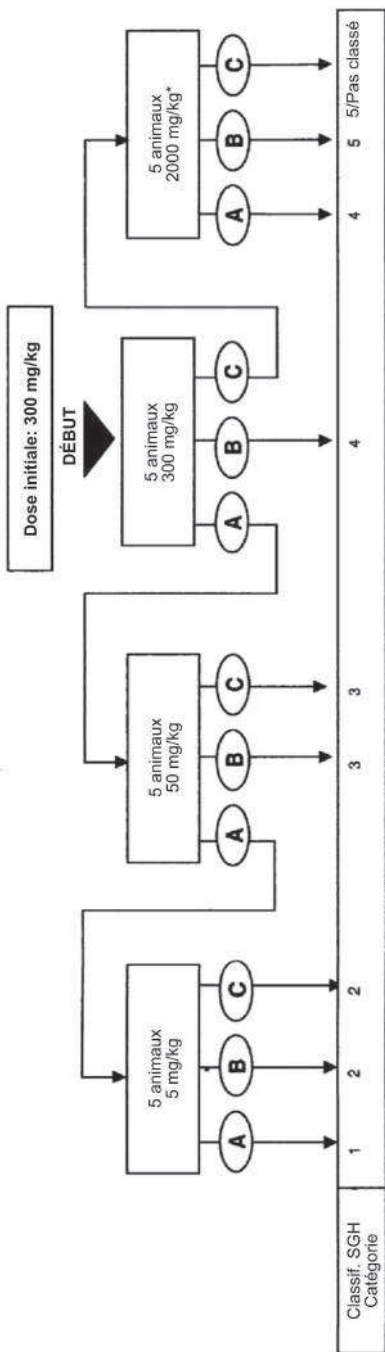


* pour le résultat (A) à 5 mg/kg, il y a une étape supplémentaire facultative pour confirmer la classification SGH : voir section 1.5.2

ANNEXE 2

SCHÉMA POUR L'ÉTUDE PRINCIPALE





Taille du groupe
 Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation.

* **Prépondérance des considérations de protection des animaux**
 Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat **A**



ANNEXE 3

CRITÈRES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI DONT ON PRÉSUME QUE LA DL₅₀ EST SUPÉRIEURE À 2 000 mg/kg, SANS RECOURIR À L'ESSAI

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL₅₀ orale ou cutanée comprise dans la plage 2 000 - 5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par $2\,000\text{ mg/kg} < DL_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$, dans les cas suivants:

- a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas de l'annexe 2 oriente la substance vers cette catégorie;
- b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL₅₀ se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;
- c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée, et
 - il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou
 - une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
 - lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissément des poils ou aspect mal soigné, ou
 - quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS À DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 mg/kg

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire à une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée. Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (9).

Étude d'orientation

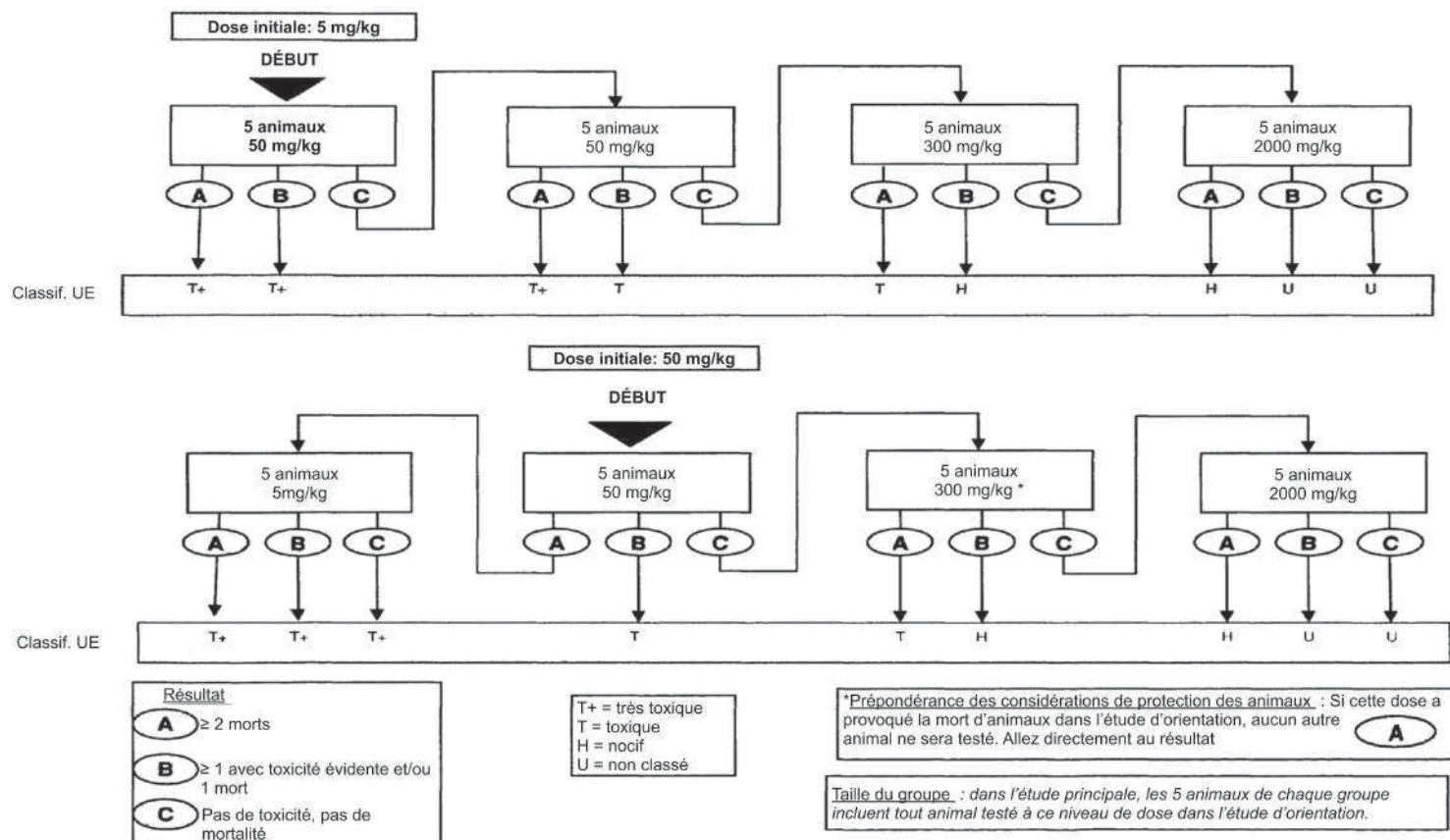
Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée à l'annexe 1 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude d'orientation et que le résultat A (mortalité) est obtenu, il faut tester un deuxième animal à 2 000 mg/kg; si le premier résultat est B ou C (toxicité évidente ou pas de toxicité), on pourra choisir 5 000 mg/kg comme dose initiale dans l'étude principale. De même, si on choisit une dose initiale différente de 5 000 mg/kg, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat B ou C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg imposera une dose initiale de 2 000 mg/kg pour l'étude principale, alors qu'un résultat B ou C imposera 5 000 mg/kg comme dose initiale pour cette étude.

▼B**Étude principale**

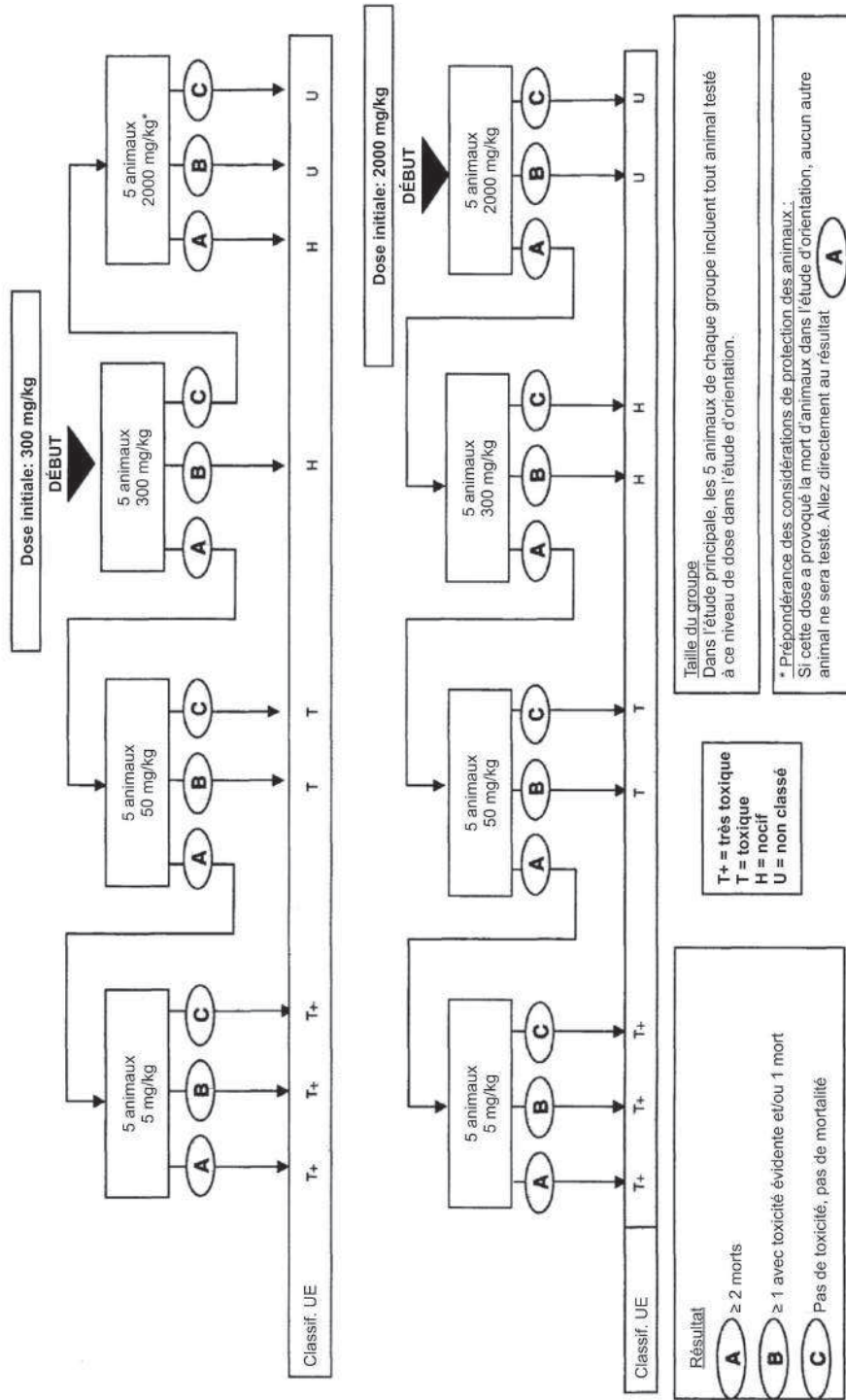
Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée à l'annexe 2 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude principale et que le résultat A (> 2 morts) est obtenu, il faut tester un second groupe à 2 000 mg/kg. Si le premier résultat est B (toxicité évidente et/ou ≤ 1 mort) ou C (pas de toxicité), la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH. De façon similaire, si une dose initiale différente de 5 000 mg/kg est choisie, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg entraînera la classification de la substance dans la catégorie 5 du SGH; si le résultat obtenu est B ou C, la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH.

MÉTHODE D'ESSAI B.1 bis

Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) [voir référence (8)]



▼B



▼B**B.1 ter. TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 423 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La méthode de la classe de toxicité aiguë (1) décrite dans cet essai est une procédure séquentielle qui utilise trois animaux de même sexe à chaque étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette procédure est reproductible, utilise très peu d'animaux et permet de classer des substances par ordre de toxicité de la même manière que les autres méthodes de toxicité aiguë. La méthode par classe de toxicité aiguë est fondée sur des évaluations biométriques (2) (3) (4) (5) avec des doses prédéterminées, convenablement espacées de manière à permettre le classement des substances les unes par rapport aux autres aux fins de l'évaluation des dangers. La méthode, telle qu'elle a été adoptée en 1996, a été largement validée in vivo par rapport aux données de DL₅₀ issues de la littérature, tant sur le plan national (6) que sur le plan international (7).

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (8). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 ter.

Il n'est pas nécessaire d'administrer des substances d'essai à des niveaux de dose dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait des propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats, au même titre que les animaux morts pendant l'essai. Les critères pour décider de tuer les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (9).

La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances selon le système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (10).

En principe, la méthode ne vise pas à calculer une valeur précise de DL₅₀, mais elle permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée comme létale, puisque la mort d'une partie des animaux reste le principal effet observé dans cet essai. La méthode permet de déterminer une DL₅₀ uniquement dans le cas où au moins deux doses donnent une mortalité supérieure à 0 % et inférieure à 100 %. Grâce à l'utilisation d'un choix de doses prédéterminées, indépendamment de la substance d'essai, et au lien explicite entre classification et nombre d'animaux dans différents états observés, la cohérence entre laboratoires est favorisée.

▼B

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, le résultat de tout autre essai de toxicité réalisé in vivo ou in vitro sur la substance, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité orale aiguë: effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

SGH: système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du BIT (communication des dangers) et coordonnée par l'IOMC (Interorganisation Program for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente: il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs, il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [pour de plus amples détails, voir (9)].

DL₅₀ (dose orale létale 50 %): dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL₅₀ est exprimée en poids de la substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond: l'état avant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails, voir (9)].

Mort prévisible: présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails, voir (9)].

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Le principe de cet essai est que, avec un processus séquentiel et un nombre minimal d'animaux par étape, il est possible d'obtenir des informations sur la toxicité aiguë de la substance d'essai qui sont suffisantes aux fins de sa classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée selon une procédure séquentielle utilisant trois animaux de même sexe (généralement des femelles) à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:

— arrêt de l'essai,

— administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,

— administration de la dose immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure à trois animaux supplémentaires.

Des détails concernant le mode opératoire sont décrits à l'annexe 1. La méthode permet de se prononcer sur la classification de la substance d'essai dans une classe de toxicité délimitée par des valeurs préalablement fixées de DL₅₀.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (9). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL₅₀ montre en effet qu'il y a peu de différence de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a des différences, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (11). Si, toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains, issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de ± 20 % du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

▼B**1.4.3. Préparation des animaux**

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

1.4.4. Préparation des doses

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration, sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5. MODE OPÉRATOIRE**1.5.1. Administration des doses**

La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2. Nombre d'animaux et niveaux des doses

Trois animaux sont utilisés à chaque étape. Pour la dose initiale, on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg de poids corporel. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer une mortalité chez les animaux traités. Les schémas de l'annexe 1 décrivent la marche à suivre pour chacune des doses initiales. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

▼B

Lorsque certaines informations donnent à penser qu'il est peu probable que la dose initiale la plus élevée (2 000 mg/kg de poids corporel) provoque une mortalité, il convient de procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée par souci de protection des animaux est 300 mg/kg de poids corporel.

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce que l'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre.

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir annexe 2). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

1.5.3. Essai limite

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité ne se manifeste qu'au-delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Un essai limite à la dose de 2 000 mg/kg peut être effectué sur six animaux (trois animaux par étape). Exceptionnellement, un essai limite à la dose de 5 000 mg/kg peut être réalisé sur trois animaux (voir annexe 2). Si une mortalité liée à la substance est observée, il peut s'avérer nécessaire de poursuivre l'essai à la dose immédiatement inférieure.

1.6. OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire. Les moments où apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, particulièrement quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes (12). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

▼B

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (9). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1. Poids corporel

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai, et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

1.6.2. Pathologie

Tous les animaux (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. RÉSULTATS

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et, pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. RAPPORT**3.1. Rapport d'essai**

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation),
- données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée,

▼B

- état microbiologique des animaux, s'il est connu,
- nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles),
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

- détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré,
- détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau),
- justification du choix de la dose initiale.

Résultats:

- tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité; nature, gravité et durée des effets),
- tableau des poids corporels et des variations de poids,
- poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, ainsi qu'au moment de la mort ou du sacrifice,
- date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice,
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle,
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques le cas échéant.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Roll, R., Höfer-Bosse, Th. And Kayser, D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett., Suppl.* 31, p. 86
- (2) Roll, R., Riebschläger, M., Mischke, U. and Kayser, D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, p. 336-341.
- (3) Diener, W., Sichha, L., Mischke, U., Kayser, D. and Schlede, E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, p. 559-610
- (4) Diener, W., Mischke, U., Kayser, D. and Schlede, E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, p. 729-734.
- (5) Diener, W., and Schlede, E. (1999). Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, p. 129-134
- (6) Schlede, E., Mischke, U., Roll, R. and Kayser, D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, p. 455-470.

▼B

- (7) Schlede, E., Mischke, U., Diener, W. and Kayser, D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, p. 659-670.
- (8) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.
- (9) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.
- (10) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (11) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, p. 223-231.
- (12) Chan, P.K. and Hayes, A.W. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

▼B

ANNEXE I

MARCHE À SUIVRE POUR CHACUNE DES DOSES INITIALES

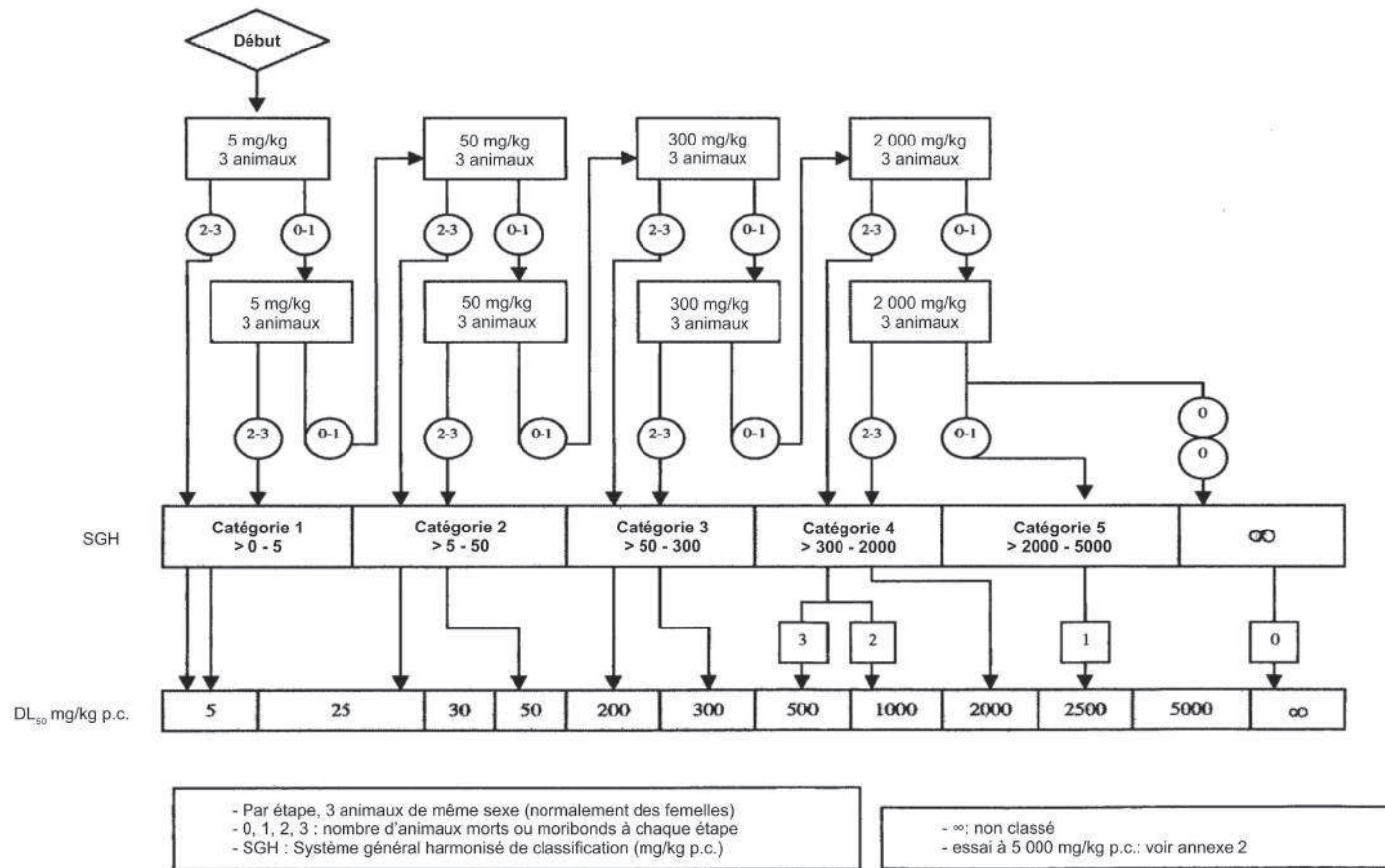
REMARQUES GÉNÉRALES

Les divers schémas d'essai présentés dans la présente annexe indiquent la marche à suivre pour chaque dose initiale.

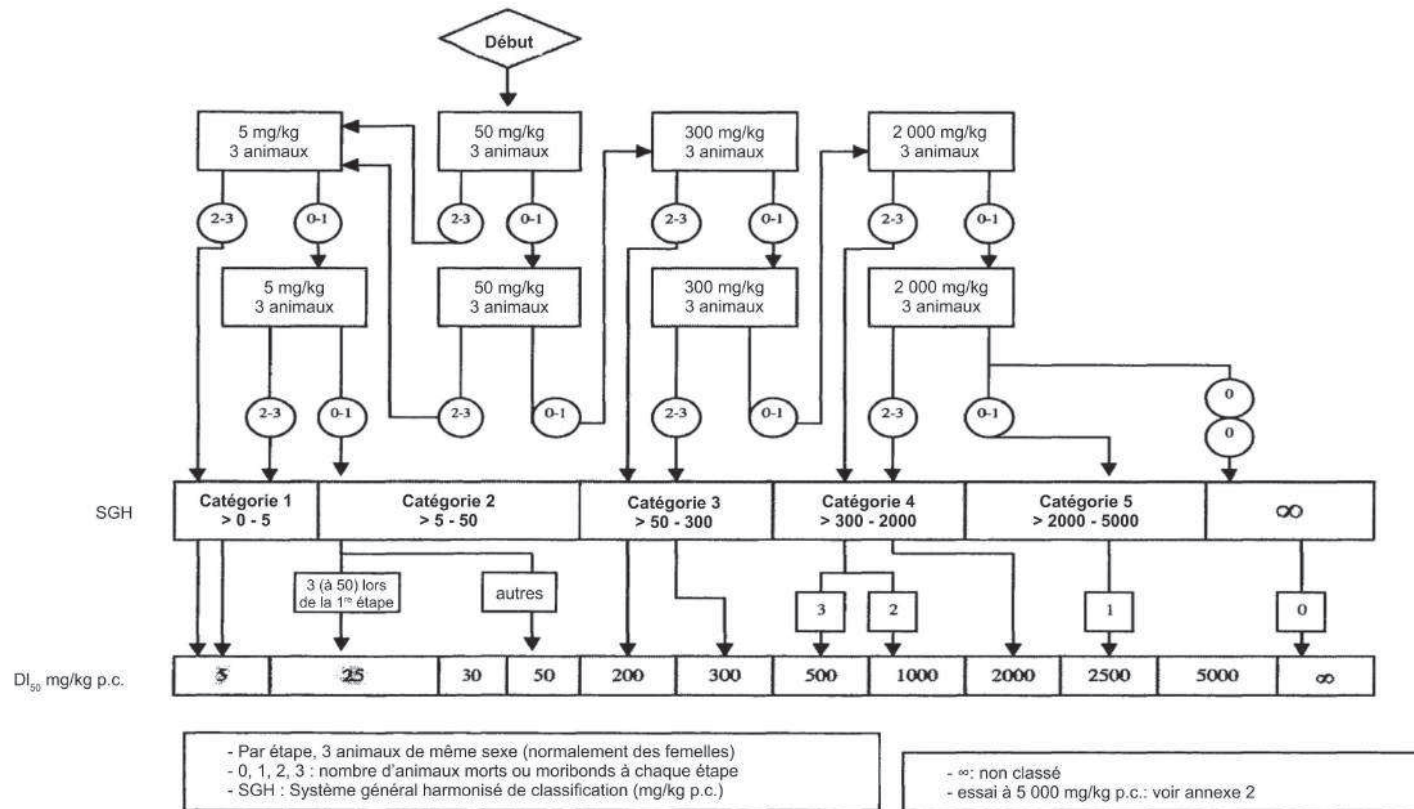
- Annexe 1 A: dose initiale de 5 mg/kg de poids corporel
- Annexe 1 B: dose initiale de 50 mg/kg de poids corporel
- Annexe 1 C: dose initiale de 300 mg/kg de poids corporel
- Annexe 1 D: dose initiale de 2 000 mg/kg de poids corporel

En fonction du nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés, la marche à suivre est indiquée par les flèches.

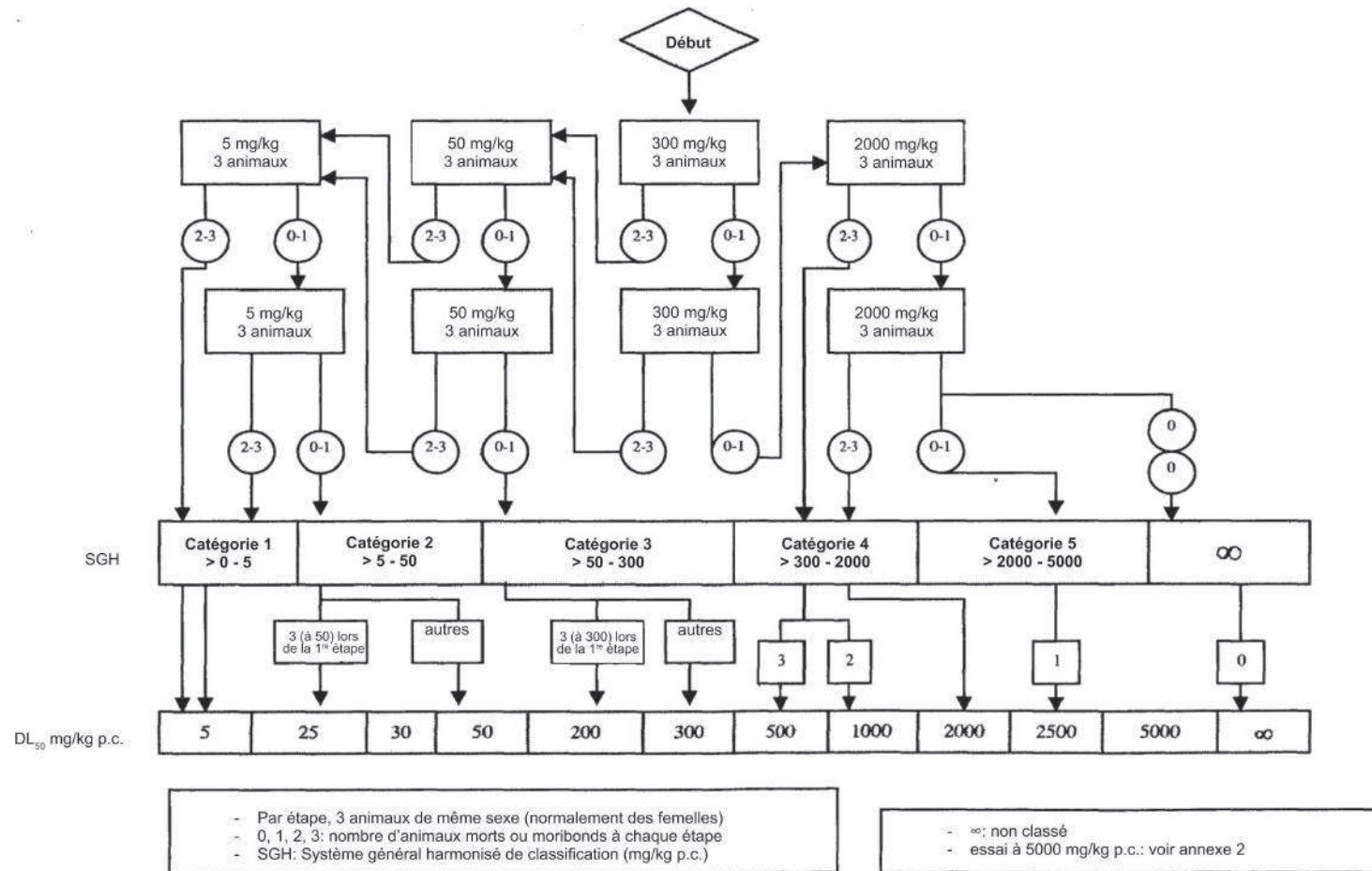
MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 5 MG/KG DE POIDS CORPOREL



MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 50 MG/KG DE POIDS CORPOREL

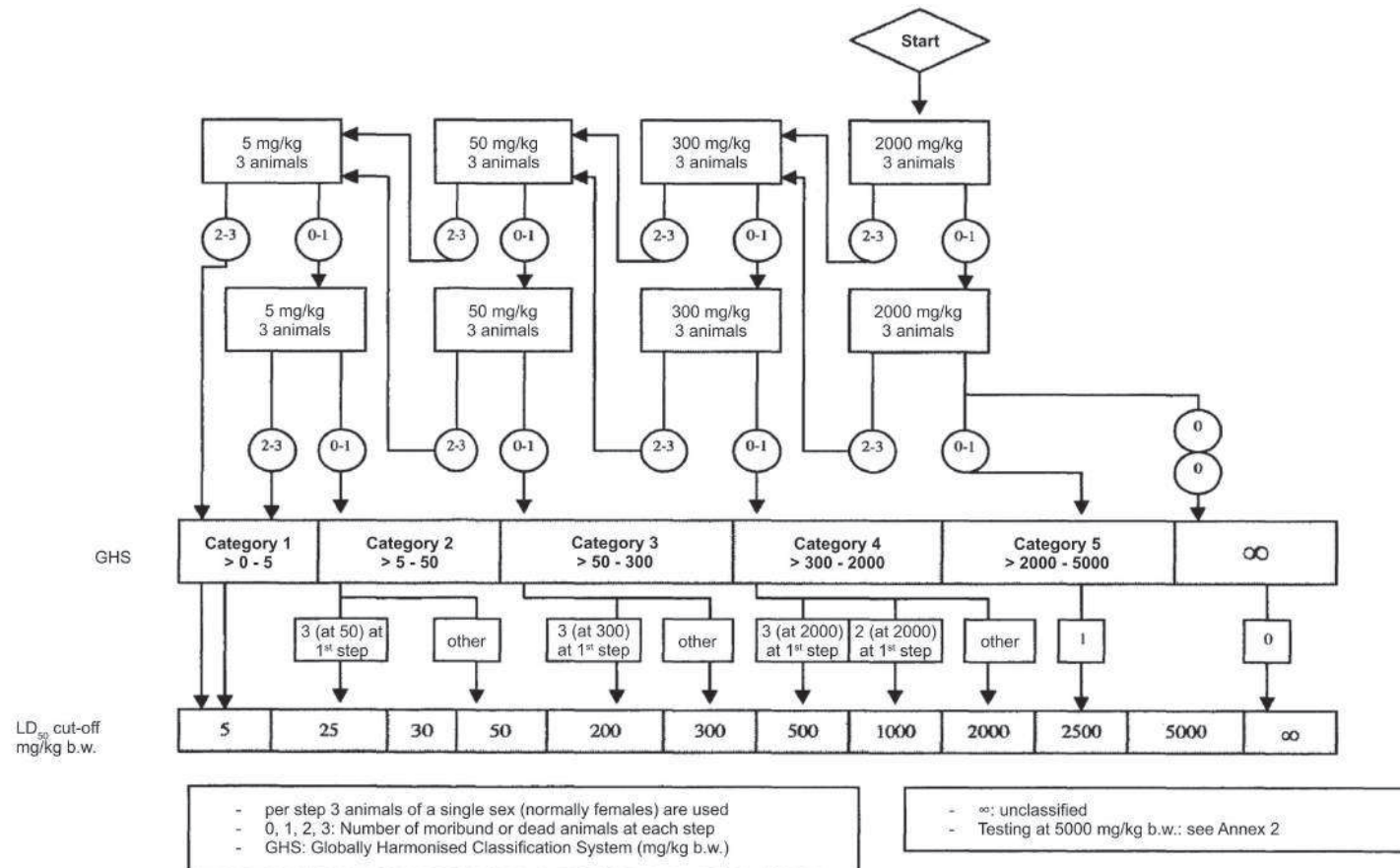


MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG DE POIDS CORPOREL



ANNEXE 1 D

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 2 000 MG/KG DE POIDS CORPOREL





ANNEXE 2

**CRITÈRES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI
DONT ON PRÉSUME QUE LA DL₅₀ EST SUPÉRIEURE À 2 000
MG/KG, SANS RECOURIR À L'ESSAI**

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL₅₀ orale ou cutanée comprise dans la plage 2 000 - 5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Les substances d'essai devraient être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2 000 mg/kg < DL₅₀ < 5 000 mg/kg, dans les cas suivants:

- a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas des annexes 1A à 1 D oriente la substance vers cette catégorie;
- b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL₅₀ se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;
- c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée, et
 - il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou
 - une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
 - lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissément des poils ou aspect mal soigné, ou
 - quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS À DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 MG/KG

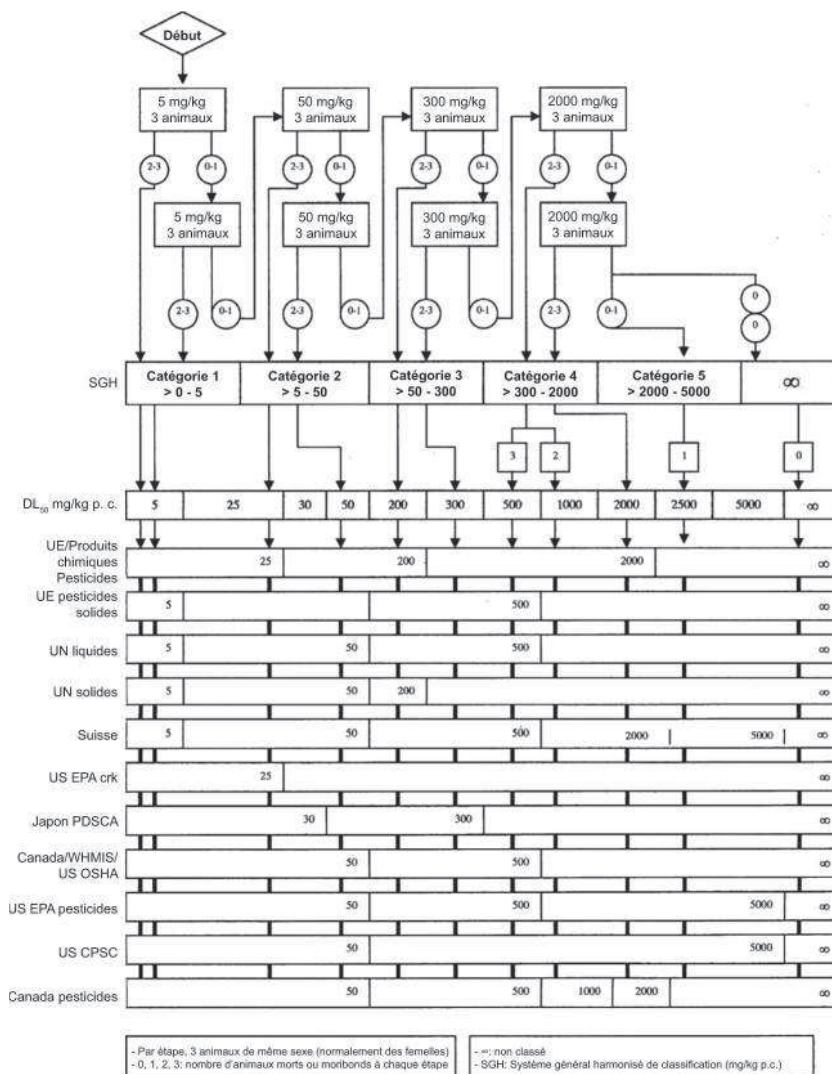
Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (10). Aucun essai ne doit être effectué à des doses plus élevées.

Lorsqu'un essai à 5 000 mg/kg est nécessaire, une seule étape suffit (c'est-à-dire trois animaux). Si le premier animal traité meurt, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg comme indiqué dans les schémas de l'annexe 1. Si le premier animal traité survit, deux autres animaux sont traités. Si un seul des trois animaux meurt, la DL₅₀ est présumée supérieure à 5 000 mg/kg. Si les deux animaux meurent, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg.

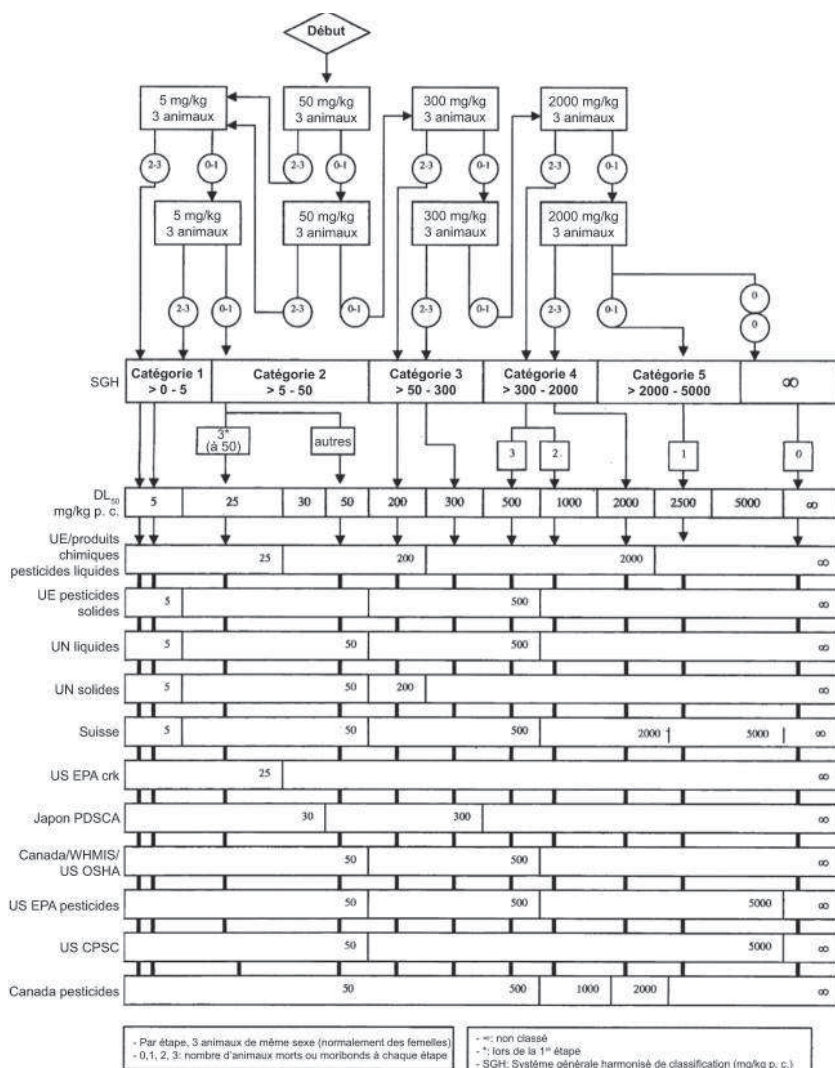
▼B

ANNEXE 3

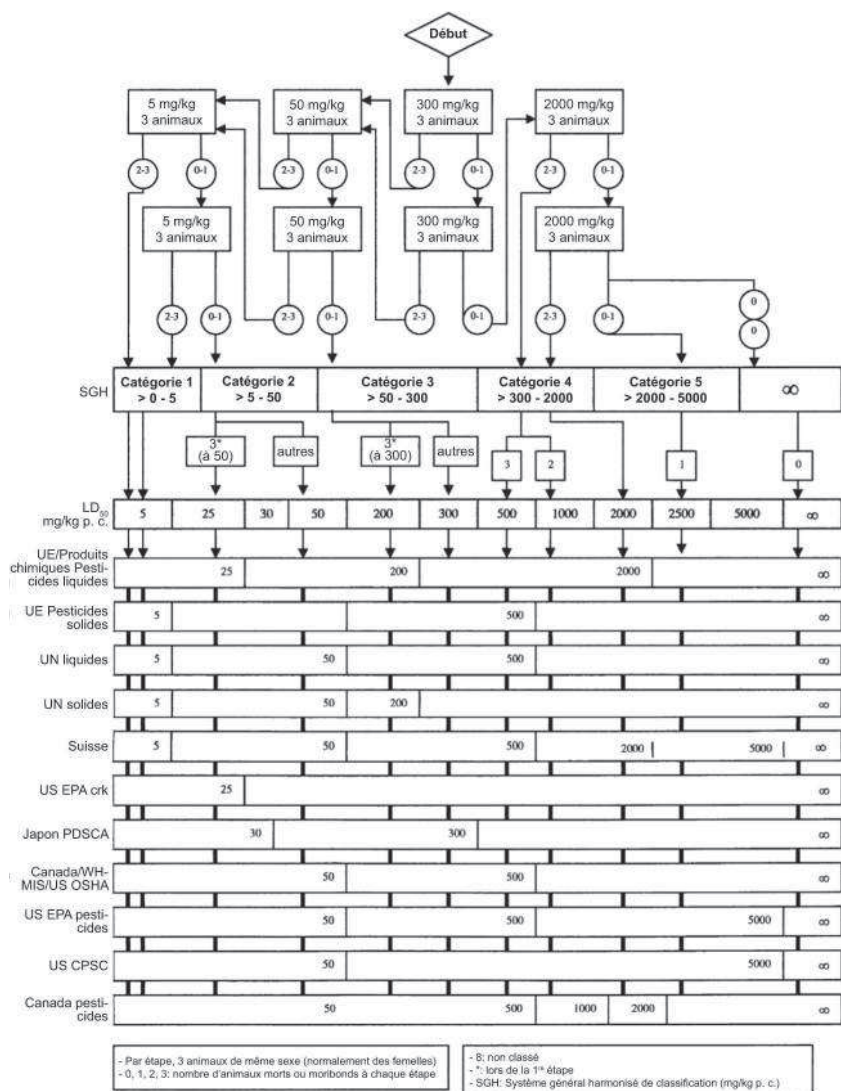
MÉTHODE D'ESSAI B.1 tris Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) [voir référence (8)]



▼B



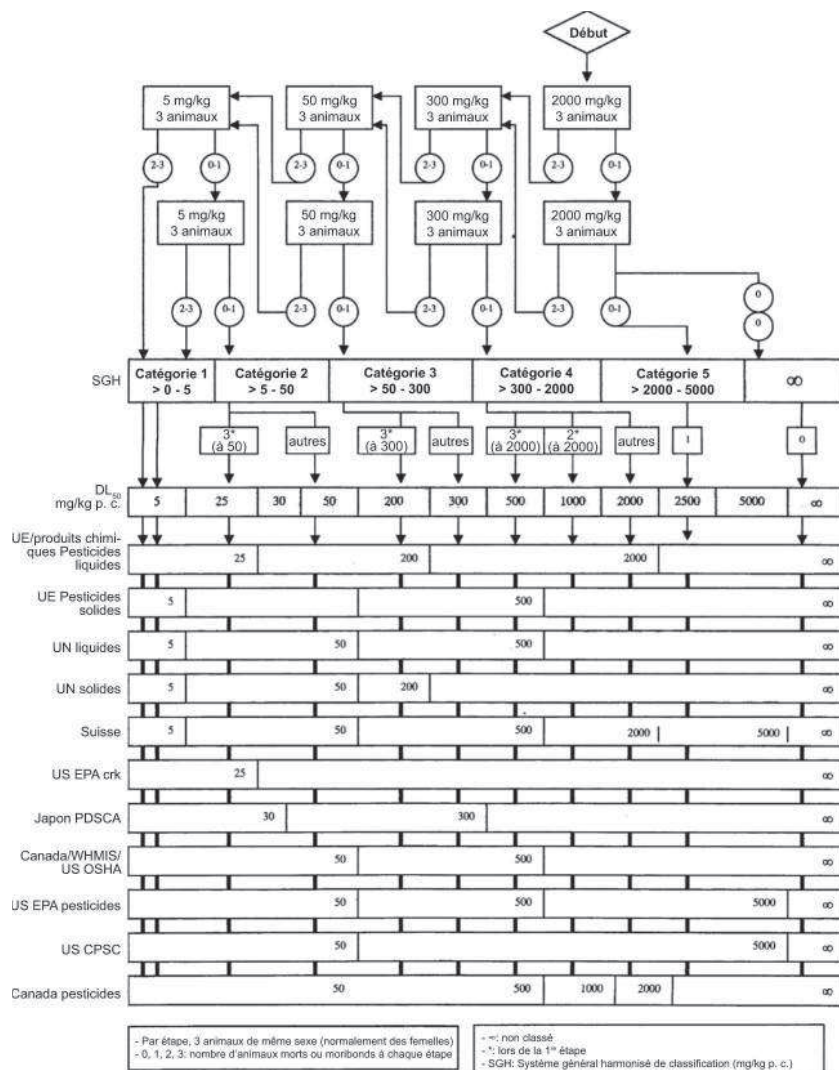
▼B



- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
 - 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape

- 0: non classé
 - *: lors de la 1^{re} étape
 - SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼B



▼M4**B.2. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 403 (2009) de l'OCDE (1) pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice 403 pour les essais de toxicité aiguë par inhalation a été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.2 (équivalente à la ligne directrice 403 révisée) a été conçue afin d'offrir une plus grande souplesse, de réduire l'utilisation d'animaux et de répondre aux exigences réglementaires. Elle décrit deux types d'études: un protocole traditionnel de détermination de la CL₅₀ et un protocole «concentration × temps» (C × t). Les principales caractéristiques de cette ligne directrice tiennent au fait qu'elle permet d'obtenir une relation concentration-réponse pour les effets non létaux à létaux, afin d'en déduire une concentration létale médiane (CL₅₀), une concentration seuil non létale (comme la CL₀₁) et une pente, ainsi que de déterminer si un des sexes est plus sensible à la substance d'essai. Le protocole C × t est utilisé lorsque s'applique une réglementation particulière ou pour un besoin scientifique qui nécessite un essai sur des animaux pour plusieurs durées d'exposition différentes, par exemple à des fins d'aménagement du territoire ou de planification des interventions d'urgence: calcul des niveaux guides d'exposition aiguë, recommandations pour la planification des mesures d'urgence, niveaux seuil d'exposition aiguë, etc.
2. On trouvera dans le document d'orientation n° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (document d'orientation 39) des indications sur la conduite et l'interprétation des études liées à la présente méthode d'essai (2).
3. Le document d'orientation 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai.
4. La présente méthode d'essai permet de caractériser les substances d'essai, de les soumettre à une évaluation quantitative des risques, et de classer conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 (3). Le document d'orientation 39 (2) fournit des indications sur le choix de la méthode d'essai appropriée pour les essais de toxicité aiguë. Lorsque seules sont requises des informations sur la classification et l'étiquetage, le chapitre B.52 de la présente annexe (4) est généralement recommandé [voir document d'orientation 39 (2)]. La méthode d'essai B.2 n'est pas spécifiquement destinée à tester des matériaux spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes [par exemple, le chapitre B.52 de la présente annexe (4)] dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise, son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine, les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées, voir document d'orientation 39 (2).

▼ **M4**

6. Il convient d'éviter autant que possible de tester des substances corrosives et/ou irritantes à des concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance sévère et/ou une détresse. Pour déterminer s'il est possible de renoncer à des essais complémentaires, le potentiel de corrosion/d'irritation fait l'objet d'une évaluation reposant sur un jugement d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal (provenant, par exemple, d'essais à doses répétées réalisés à des concentrations non corrosives ou irritantes), données *in vitro* existantes [par exemple chapitres B.40 (5), B.40 *bis* (6) de la présente annexe, ou ligne directrice 435 de l'OCDE (7)], valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente. À des fins réglementaires spécifiques (par exemple pour l'établissement de plans d'urgence), la présente méthode d'essai peut être utilisée pour exposer des animaux à ces substances car elle donne au directeur de l'étude ou à l'investigateur principal la maîtrise du choix des concentrations cibles. Celles-ci ne doivent cependant pas induire d'effets corrosifs/irritants importants, mais elles sont suffisantes pour prolonger la courbe de concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Ces concentrations sont choisies au cas par cas et une justification du choix des concentrations est apportée, voir document d'orientation 39 (2).

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La présente méthode d'essai B.2 révisée doit en principe permettre d'obtenir des informations suffisantes sur la toxicité aiguë d'une substance d'essai pour procéder à son classement, et fournir les données sur sa létalité nécessaires aux évaluations quantitatives des risques (CL_{50} , CL_{01} et pente, par exemple) pour l'un des sexes ou les deux. Cette méthode d'essai propose deux méthodes. La première suit un protocole traditionnel dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration limite (essai limite) ou à une série de concentrations suivant un processus séquentiel pendant une durée prédéterminée de quatre heures en général. Des objectifs réglementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. La seconde méthode suit un protocole «concentration x temps» ($C \times t$) dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration (concentration limite) ou à une série de concentrations différentes sur des durées différentes.
8. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Ils sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (8).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Choix des espèces animales**

9. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

10. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel n'excède pas, pour chaque sexe, $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

▼M4**Conditions d'élevage des animaux**

11. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambre d'inhalation

12. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est alors justifié dans le rapport d'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veille à ce que le volume total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

CONDITIONS D'EXPOSITION**Administration des concentrations**

13. Les expositions «nez seul» peuvent durer jusqu'à 6 heures pour les rats. Pour les souris, les expositions «nez seul» ne dépassent pas 4 heures en général. Si des essais d'une durée plus longue sont nécessaires, une justification est apportée, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux exposés «corps entier» à des aérosols demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.
14. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

▼ M4**Répartition granulométrique**

15. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm , avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0 (2) (9) (10). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide de l'appareil respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

16. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale, l'eau est choisie de préférence. Les substances particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

17. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce dernier est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION**Débit d'air dans la chambre d'exposition**

18. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul» lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (2) (11). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

▼ M4**Température et humidité relative de la chambre d'exposition**

19. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier» l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est surveillée et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour des durées plus courtes. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

20. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

21. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une préétude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.
22. Un seul lot de la substance d'essai est utilisé, si possible, et l'échantillon est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
23. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible et suivie soit en continu, soit de façon intermittente suivant la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, on a recours à quatre échantillons par exposition pour les concentrations d'essai suivantes. Les écarts entre la concentration

▼ M4

dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs ou $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95} . Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

24. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisit donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la substance active principale dans le mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange et pas uniquement pour la substance active ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

25. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 15).

MODE OPÉRATOIRE

26. Les deux types d'études décrits ci-dessous sont le protocole traditionnel et le protocole $C \times t$. Tous deux peuvent comprendre une étude préliminaire, une étude principale et/ou un essai limite (protocole traditionnel) ou un essai à une concentration limite ($C \times t$). Si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à la substance d'essai, le directeur de l'étude peut choisir de réaliser ces essais avec seulement des animaux de ce sexe. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Avant le début de l'étude, toutes les données disponibles sont examinées afin de réduire l'usage des animaux. Par exemple, les données obtenues selon le chapitre B.52 de la présente annexe (4) peuvent supprimer la nécessité d'une étude préliminaire et aussi démontrer si l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, voir document d'orientation 39 (2).

▼M4

PROTOCOLE TRADITIONNEL

Considérations générales sur le protocole traditionnel

27. Dans une étude traditionnelle, des groupes d'animaux sont exposés à une substance d'essai pendant une période de temps fixée (généralement 4 heures) dans une chambre d'exposition «nez seul» ou «corps entier». Les animaux sont exposés soit à une concentration limite (essai limite), soit à trois concentrations au minimum selon une procédure séquentielle (étude principale). Une étude préliminaire peut précéder l'étude principale, sauf s'il existe déjà des informations concernant la substance d'essai, provenant par exemple d'une étude précédente effectuée selon l'étude B.52, voir document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole traditionnel

28. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai, d'identifier des différences entre les sexes quant à la sensibilité à cette substance, et de choisir plus facilement les niveaux de concentration pour l'étude principale ou l'essai limite. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les données (Q)SAR et les données correspondant à des produits chimiques analogues. Pour chaque concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles (il peut être nécessaire d'utiliser 3 animaux par sexe pour établir une différence de sensibilité entre les sexes). Une étude préliminaire peut être effectuée avec une seule concentration, ou plusieurs si nécessaire. Elle ne porte pas sur un nombre d'animaux ou de concentrations tel qu'elle ressemblerait à une étude principale. Il est possible d'utiliser les résultats d'une étude B.52 (4) précédente au lieu de réaliser une étude préliminaire, voir document d'orientation 39 (2).

Essai limite pour le protocole traditionnel

29. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Dans un essai limite, un seul groupe de trois mâles et trois femelles est exposé à la substance d'essai à une concentration limite. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé.
30. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences réglementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire d'un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) n° 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais aux concentrations limites ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

▼ **M4**

31. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration limite, les résultats de l'essai limite peuvent servir d'étude préliminaire pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui devra être testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole traditionnel

32. Une étude principale fait en général appel à cinq mâles et cinq femelles (ou cinq animaux du sexe le plus sensible, s'il est connu) par niveau de concentration, avec au minimum trois niveaux de concentration. Les niveaux de concentration sont suffisamment nombreux pour que l'on puisse obtenir une analyse statistique fiable. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible pour le groupe suivant. Pour les essais de toxicité par inhalation, qui nécessitent des technologies sophistiquées, il ne sera pas toujours possible de procéder ainsi, c'est pourquoi l'exposition des animaux à la concentration supérieure devra se baser sur l'expérience acquise et un jugement scientifique. Pour les essais portant sur des mélanges, il convient de se référer au document d'orientation 39 (2).

PROTOCOLE «CONCENTRATION × TEMPS» (C × T)

Considérations générales sur le protocole C × t

33. Une étude séquentielle «concentration × temps» (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Avec cette approche, les animaux sont exposés à la substance d'essai à plusieurs niveaux de concentration et pour des durées d'exposition variables. Tous les essais sont réalisés dans des chambres d'exposition «nez seul», les chambres «corps entier» ne se prêtant pas à ce protocole. Un exemple de procédure séquentielle illustrant ce protocole est présenté à l'appendice 1. Une analyse de simulation a montré que le protocole traditionnel et le protocole C × t étaient tous les deux capables de donner des valeurs fiables de la CL₅₀, mais que le protocole C × t permettait en général d'obtenir des valeurs plus sûres pour la CL₀₁ et la CL₁₀ (15).
34. Une analyse de simulation a démontré qu'il convient généralement d'utiliser deux animaux par intervalle de C × t (un animal de chaque sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible) pour tester 4 concentrations et 5 durées d'exposition lors de l'étude principale. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser deux rats de chaque sexe par intervalle de C × t (15), de manière à réduire le biais et la variabilité des estimations, augmenter le taux de succès de l'estimation et améliorer la couverture de l'intervalle de confiance. Cependant, en cas d'ajustement insuffisant aux données (en utilisant un animal par sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible), une cinquième concentration d'exposition peut également suffire. Pour plus d'informations sur le nombre d'animaux et les concentrations à utiliser pour une étude C × t, se reporter au document d'orientation 39 (2).

▼ M4**Étude préliminaire pour le protocole C × t**

35. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai et facilite le choix des niveaux de concentration pour l'étude principale. Une étude préliminaire avec au maximum trois animaux par sexe et par concentration (pour plus de détails, voir l'appendice III du document d'orientation 39) (2) peut être utilisée afin de sélectionner une concentration de départ appropriée pour l'étude principale et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Il peut en effet être nécessaire de recourir à trois animaux par sexe pour établir une différence selon le sexe. Ces animaux sont soumis à une exposition unique, d'une durée de 240 minutes en général. Pour évaluer la faisabilité de la production d'atmosphères d'essai appropriées, des essais techniques préliminaires sans animaux sont réalisés. Il n'est généralement pas nécessaire de procéder à une étude préliminaire si l'on dispose de données de mortalité provenant d'une étude effectuée suivant la méthode B.52 (4). Pour choisir la concentration cible initiale dans une étude B.2, le directeur de l'étude tient compte des profils de mortalité observés dans n'importe quelle étude B.52 (4) disponible, pour les deux sexes et pour toutes les concentrations testées, voir document d'orientation 39 (2).

Concentration initiale pour le protocole C × t

36. La concentration initiale (Session d'exposition I) (voir appendice 1) est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Des groupes constitués d'un animal de chaque sexe sont exposés à cette concentration pendant des périodes de durée variable (15, 30, 60, 120 ou 240 minutes, par exemple), soit un total de 10 animaux, pour ce qu'on appelle la Session d'exposition I (voir appendice 1).
37. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences réglementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, l'objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) n° 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais au-delà de la concentration limite ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est alors fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai à la concentration initiale pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai à cette concentration.
38. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration initiale, les résultats obtenus à cette concentration peuvent servir de point de départ pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui est testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

▼ **M4****Étude principale pour le protocole C × t**

39. La concentration initiale (session d'exposition I) (voir appendice 1) testée dans l'étude principale est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Si une mortalité a été observée pendant ou après la session I, l'exposition minimale (C × t) qui a provoqué la mortalité sert de guide pour déterminer la concentration et les périodes d'exposition pour la session II. Chaque session d'exposition suivante dépendra de la session précédente (voir appendice 1).
40. Pour de nombreuses substances d'essai, les résultats obtenus à la concentration initiale, plus ceux obtenus lors de trois sessions d'exposition supplémentaires sur une échelle de temps plus courte (la durée des périodes d'exposition successives suivant une progression géométrique de facteur $\sqrt{2}$), sont suffisants pour établir la relation de mortalité C × t (15). Nonobstant, il peut être utile de recourir à une cinquième concentration d'exposition [voir appendice 1 et document d'orientation 39 (2)]. Pour le traitement mathématique des résultats concernant le protocole C × t, voir appendice 1.

OBSERVATIONS

41. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec une toxicité de la substance d'essai qui impliquerait d'euthanasier les animaux plus tôt. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération, voir document d'orientation 19 (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.
42. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différenciation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

43. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci et au moins les jours 1, 3, et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite), ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveille donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 %, ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

▼ M4**Pathologie**

44. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
45. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Peuvent aussi être examinés les organes montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures, et ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Résultats**

46. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

- description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,
- espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- méthode de randomisation,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),
- description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

▼ M4*Substance d'essai:*

- nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),
- données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

- justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),
- données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

- description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,
- source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,
- équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,
- source de l'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,
- méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,
- différence de pression (positive ou négative),
- orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»),
- homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,
- situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,
- débits d'air, débit d'air par orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»),
- informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,
- temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),
- nombre de changements de volume par heure,
- doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

- justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,
- concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),
- concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,

▼ M4

- toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.); les unités de volume (ppm, ppb, etc.) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses;
- répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique σ_g , ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales:

- détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,
- description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,
- détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),
- justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

- tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g ,
- tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets),
- poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,
- estimations de la létalité (CL₅₀, DL₀₁ par exemple), notamment limites de confiance à 95 % et pente (si elle est fournie par la méthode d'évaluation),
- relation statistique, y compris l'estimation du facteur n (pour le protocole C × t). Le nom du logiciel de statistiques utilisé est indiqué.

▼ **M4***Discussion et interprétation des résultats:*

- un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,
- la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,
- une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (8),
- si un essai suivant le chapitre B.52 de la présente annexe (4) a dû être interrompu en faveur de la présente méthode d'essai B.2, les justifications sont fournies,
- la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,
- la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (2009). Toxicité aiguë par inhalation. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 403, OCDE Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (3) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).
- (4) Chapitre B.52 de la présente annexe, Toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë (ATC).
- (5) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).
- (6) Chapitre B.40 bis de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine.
- (7) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (8) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼ M4

- (11) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.
- (12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.
- (13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.
- (14) Ten Berge W.F. and Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.
- (15) OCDE (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and $C \times t$ Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et évaluations n° 104, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (16) Finney D.J. (1977). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

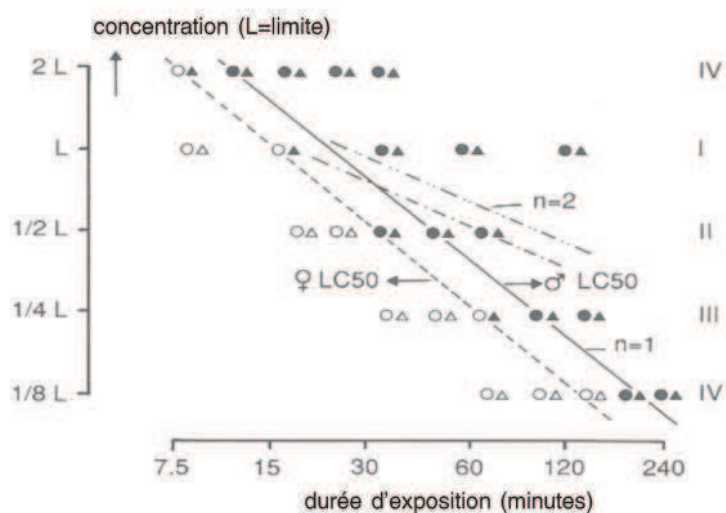
▼ **M4***Appendice I***Protocole C × t**

1. Une étude séquentielle «Concentration × Temps» (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Elle est privilégiée lorsqu'une réglementation particulière s'applique ou pour un besoin scientifique nécessitant des essais sur animaux portant sur des durées d'exposition multiples, par exemple à des fins d'établissement de plans d'intervention d'urgence ou d'aménagement du territoire. Cette approche débute en général avec un essai à la concentration limite (session d'exposition I) au cours duquel les animaux sont exposés à la substance d'essai pendant cinq périodes de durées différentes (15, 30, 60, 120 et 240 minutes par exemple) de façon à obtenir plusieurs durées d'exposition pour une même séance (voir figure 1). Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Ces niveaux ne peuvent être dépassés que s'il est indispensable de réaliser des essais à ces niveaux de concentration pour des raisons réglementaires ou scientifiques (voir le paragraphe 37 de la méthode B.2).
2. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, une étude préliminaire peut être réalisée, au cours de laquelle des groupes d'au maximum 3 animaux par sexe sont exposés à des concentrations cibles sélectionnées par le directeur de l'étude, en général sur une durée de 240 minutes.
3. Si une concentration limite est testée lors de la session d'exposition I et que l'on observe une mortalité inférieure à 50 %, il n'est pas nécessaire d'effectuer des essais supplémentaires. Si, pour des raisons réglementaires ou scientifiques, il est indispensable d'établir la relation concentration/temps/réponse pour des niveaux plus élevés que la concentration limite indiquée, l'exposition suivante est réalisée, par exemple, au double de la concentration limite (c'est-à-dire 2L dans la figure 1).
4. Si une toxicité est observée à la concentration limite, des essais supplémentaires (étude principale) sont nécessaires. Ces expositions supplémentaires sont réalisées soit à des concentrations plus faibles (dans la figure 1: sessions d'exposition II, III ou IV'), soit à des concentrations plus fortes sur des durées plus courtes (dans la figure 1, session d'exposition IV) qui sont adaptées et moins espacées.
5. L'essai (concentration initiale et concentrations supplémentaires) est réalisé avec l'animal de chaque sexe par point concentration/temps, ou avec 2 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser 2 rats de chaque sexe par point concentration/temps, ou 4 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps (15). L'utilisation de 2 animaux par point concentration/temps réduit en général le biais et la variabilité des estimations, augmente le taux de succès de l'estimation et améliore la couverture de l'intervalle de confiance lié à ce protocole. Pour plus de détails, se reporter au document d'orientation 39 (2).
6. Idéalement, chaque session d'exposition est exécutée sur une seule journée, ce qui donne la possibilité de retarder l'exposition suivante jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr de la survie des animaux, et permet au directeur de l'étude d'ajuster la concentration cible et les durées pour la prochaine séance d'exposition. Il est recommandé de commencer chaque séance d'exposition avec le groupe qui sera exposé le plus longtemps, 240 minutes par exemple, suivi du groupe qui sera exposé 120 minutes, et ainsi de suite. Si, par exemple, les animaux du groupe exposé 240 minutes meurent après 90 minutes d'exposition ou montrent des signes importants de toxicité (par exemple, modifications considérables de la respiration, notamment difficultés respiratoires), il est inutile d'exposer un groupe pendant 120 minutes car la mortalité serait très vraisemblablement de 100 %. Le directeur de l'étude choisit alors des durées d'exposition plus courtes pour cette concentration (90, 65, 45, 33 et 25 minutes par exemple).

▼ **M4**

7. La concentration dans la chambre d'exposition est mesurée régulièrement pour déterminer la concentration moyenne pondérée en fonction du temps pour chaque durée d'exposition. Autant que possible, c'est l'heure de la mort de chaque animal qui est utilisée dans l'analyse statistique (et non la durée d'exposition).
8. Il convient d'examiner les résultats des quatre premières sessions d'exposition pour repérer les éventuelles données manquantes dans la courbe concentration-temps (voir figure 1). S'il manque effectivement des données, une exposition supplémentaire (5^e concentration) peut être réalisée. La concentration et les durées d'exposition de cette 5^e exposition sont choisies de manière à combler cette lacune.
9. Toutes les sessions d'exposition (y compris la première) seront utilisées pour calculer la relation concentration-temps-réponse au moyen d'une analyse statistique (16). On utilisera si possible, pour chaque intervalle $C \times t$, la concentration moyenne pondérée en fonction du temps et la durée d'exposition jusqu'à la mort (si celle-ci intervient durant l'exposition).

Figure 1

Illustration hypothétique d'une relation concentration-temps-mortalité chez des rats

Symboles vides = survivants; symboles pleins = animaux morts

Triangles = femelles; cercles = mâles

Ligne pleine = valeurs de CL₅₀ (de 7,5 à 240 minutes) pour les mâles, n = 1

Ligne tiretée = valeurs de CL₅₀ (de 7,5 à 240 minutes) pour les femelles, n = 1

Lignes pointillées = valeurs de CL₅₀ hypothétique pour les mâles et les femelles si n avait été égal à 2 (12).

Glossaire

concentration limite.

durée d'exposition.

▼ **M4**

10. On trouvera ci-dessous un exemple de la procédure séquentielle:

Session d'exposition I – Essai à la concentration limite (voir figure 1)

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total ^(a)
- Concentration cible ^(b) = concentration limite
- Exposer cinq groupes d'animaux à cette concentration cible pendant respectivement 15, 30, 60, 120 et 240 minutes.

↓

Session d'exposition II ^(c) – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible ^(d) (1/2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$, voir figure 1).

↓

Session d'exposition III – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible ^(d) (1/4L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$, voir figure 1).

↓

Session d'exposition IV' – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible ^(d) (1/8L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$, voir figure 1).

↓ **ou**

^(a) Si aucune information n'est disponible sur la sensibilité de chaque sexe à la substance d'essai, des rats des deux sexes seront utilisés, soit 1 animal de chaque sexe par concentration. À partir d'informations existantes ou s'il apparaît au cours de cette session d'exposition qu'un des sexes est plus sensible, 10 animaux de ce sexe seront utilisés (2 animaux par point concentration/temps) à chaque niveau de concentration pour les essais suivants.

^(b) Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Si l'on s'attend à une toxicité ou en raison des résultats de l'étude préliminaire, on choisit des concentrations de départ plus faibles. Pour des besoins réglementaires ou scientifiques, des concentrations plus fortes peuvent être utilisées.

^(c) Idéalement, l'exposition des animaux au niveau de concentration suivant est retardée jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible et les durées pour la session d'exposition suivante.

^(d) La dose minimale (concentration × temps) qui provoque la mortalité au cours de l'essai à la concentration initiale (première session d'exposition) servira de guide pour déterminer la prochaine combinaison de concentrations et de durées d'exposition. Généralement, la concentration diminuera de moitié (1/2L) et les animaux seront exposés sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 ($\sqrt{2}$, voir référence 11) centrée sur le temps correspondant au niveau de la dose létale minimale (temps × concentration) observé lors de la première exposition. Dans la figure 1, la mortalité au cours de la Session d'exposition I a d'abord été observée au bout de 15 minutes; les durées de la Session II ont donc été centrées autour de 30 minutes et sont de 15, 21, 30, 42 et 60 minutes. Après les deux premières expositions, il est fortement recommandé de tracer les résultats dans un graphique similaire, comme indiqué ci-dessus, et de vérifier si la relation entre la concentration et le temps définit un angle de 45 degrés (n = 1) ou si la pente de la relation concentration-temps-réponse est moins forte (n = 2 par exemple) ou plus forte (n = 0,8 par exemple). Dans ces derniers cas, il est fortement recommandé d'adapter en conséquence les concentrations et les durées suivantes.

▼ **M4****Session d'exposition IV – Étude principale**

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus forte^(e) (2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$; voir figure 1).

Traitement mathématique des résultats pour le protocole C × t

11. Une procédure C × t constituée de 4 ou 5 concentrations d'exposition et de 5 durées d'exposition génère respectivement 20 ou 25 points de données. Avec ces points de données, la relation C × t peut être calculée à l'aide d'une analyse statistique (16):

Équation 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

où C = concentration; t = durée d'exposition, ou

Équation 2:

$$\text{Response} = f(C^n t)$$

où $n = b_1/b_2$.

Avec l'équation 1, la valeur de la CL₅₀ peut être calculée pour une période de temps donnée (par exemple, 4 heures, 1 heure, 30 minutes ou n'importe quelle période de temps comprise dans la plage des périodes de temps testées) avec P = 5 (50 % de réponse). À noter que la règle de Haber ne s'applique que lorsque n = 1. La CL₀₁ est calculée avec P = 2,67.

^(e) Dans certains cas, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration (2L) sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 ($\sqrt{2}$) centrée sur le temps correspondant au niveau de dose létale minimale observé lors de la première exposition. La durée minimale d'exposition est de préférence supérieure à 5 minutes et la durée maximale d'exposition ne dépasse pas 8 heures.

▼B**B.3. TOXICITÉ AIGUË (CUTANÉE)****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des doses croissantes de la substance à tester sont appliquées sur la peau à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier entraîne une détresse ou des douleurs intenses du fait de ses propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**1.6.1. Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expérience. Vingt-quatre heures environ avant l'épreuve, on tond ou l'on rase les poils de la région dorsale du tronc des animaux en évitant toute lésion de la peau susceptible de modifier sa perméabilité. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être suffisamment humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à assurer un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un véhicule, son influence sur la pénétration de la substance dans la peau doit être prise en considération. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

1.6.2. Conditions de l'essai**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

On peut utiliser des rats ou des lapins adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation. Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder ± 20 % de la valeur moyenne requise.

▼B1.6.2.2. *Nombre et sexe*

Cinq animaux au moins sont utilisés pour chaque dose. Ils doivent être de même sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on dispose d'informations qui montrent qu'un sexe est nettement plus sensible, les essais seront pratiqués sur des animaux de ce sexe.

Note: Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux lorsque les tests de toxicité aiguë sont effectués sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les doses doivent être soigneusement choisies, en s'efforçant au maximum de ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. *Doses*

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière à produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Tout effet irritant ou corrosif doit être pris en considération lors du choix des doses. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination acceptable de la DL₅₀.

1.6.2.4. *Essai de limite*

Un essai de limite peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2 000 mg/kg de poids corporel à un lot de 5 mâles et 5 femelles, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut être nécessaire de réaliser une étude complète.

1.6.2.5. *Période d'observation*

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant, sa durée ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent, leur durée ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de tendance à une mortalité retardée.

1.6.3. **Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface traitée peut être moindre, mais la substance d'essai doit être appliquée de manière à former un film aussi mince et uniforme que possible.

Les substances d'essai doivent être maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant pendant une période de 24 heures. La partie traitée doit, en outre, être convenablement couverte, de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer cette dernière. On peut utiliser des appareils de contention pour empêcher les animaux d'ingérer la substance d'essai mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

▼B

À la fin de la période d'application, la substance d'essai résiduelle doit être éliminée, si possible, avec de l'eau, ou au moyen d'un autre procédé de nettoyage de la peau.

Les observations doivent être consignées systématiquement au fur et à mesure qu'elles sont effectuées, en établissant une fiche individuelle pour chaque animal. Les animaux doivent être observés fréquemment le premier jour. Un examen clinique attentif doit être pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en prenant des mesures de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple autopsie ou conservation au froid des animaux trouvés morts, ainsi qu'en isolant et sacrifiant les animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications des poils, de la peau traitée, des yeux, des muqueuses ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, et enfin de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. Le moment de la mort doit être enregistré avec autant de précision que possible. Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

Estimation de la toxicité pour l'autre sexe

Après avoir mené à terme l'étude portant sur des animaux appartenant à un sexe, la substance est administrée au moins à un lot de 5 animaux de l'autre sexe, afin de déterminer si les animaux de ce sexe ne sont pas nettement plus sensibles à la substance à tester. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut être justifiée dans des circonstances particulières. Si l'on dispose d'informations appropriées qui montrent que les animaux du sexe testé sont considérablement plus sensibles, on peut se dispenser d'effectuer des essais sur les animaux de l'autre sexe.

2. **DONNÉES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres signes d'intoxication, la description des effets toxiques et les résultats de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et noté peu de temps avant l'application de la substance d'essai, puis une fois par semaine et au moment de la mort; les modifications du poids doivent être calculées et enregistrées lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause des souffrances et de l'inconfort dus à la substance sont enregistrés comme s'ils étaient morts du fait du composé étudié. La DL_{50} doit être déterminée par application d'une méthode reconnue.

L'évaluation des données doit inclure une évaluation de la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la sévérité de toutes les anomalies, y compris les anomalies de comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les modifications de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. **RÉSULTATS**

3.1. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

▼B

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales (y compris le procédé de nettoyage de la peau et le type de pansement: occlusif ou non),
- doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et des concentrations),
- sexe des animaux sur lesquels l'essai a été réalisé,
- tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés),
- moment de la mort après administration, raisons et critères justifiant l'euthanasie des animaux,
- toutes les observations,
- valeur de la DL_{50} pour le sexe soumis à une étude complète, déterminée à 14 jours (en précisant la méthode de calcul),
- intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50} , lorsque le calcul est possible,
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet),
- résultats d'autopsie,
- toutes les constatations histopathologiques,
- résultats de tout essai réalisé sur l'autre sexe,
- discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur de la DL_{50} calculée les animaux euthanasiés au cours de l'essai),
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B (point D).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point E).

▼B**B.4. TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION CUTANÉE****1. MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 404 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La mise à jour de cette méthode a porté plus particulièrement sur les possibilités d'améliorer le traitement des animaux de laboratoire et sur l'évaluation de toutes les informations existantes se rapportant aux substances d'essai en vue d'éviter les tests inutiles sur animaux. La présente méthode recommande d'analyser la valeur probante des résultats pertinents déjà disponibles avant de procéder à l'essai *in vivo* de corrosion/irritation décrit ci-après. Les données manquantes pourront être comblées par des essais séquentiels (1). La démarche expérimentale, décrite en annexe, inclut la réalisation d'essais *in vitro* validés et acceptés. Il est également recommandé d'opter, le cas échéant, pour une application successive plutôt que simultanée des trois timbres sur l'animal dans l'essai *in vivo* initial.

Pour assurer à la fois la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* tant que la valeur probante de toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau de la substance n'aura pas été analysée. Ces données comprendront les résultats d'études menées sur des humains et/ou des animaux, des données relatives à l'effet corrosif ou irritant d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (2) (3), et des résultats d'essais *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés (4) (5) (5a). Cette analyse devrait réduire la nécessité de tester *in vivo* l'effet corrosif ou irritant sur la peau des substances pour lesquelles des études antérieures ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects.

La démarche expérimentale préconisée, de type séquentiel, comporte des essais de corrosion et d'irritation *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés, et est décrite dans l'annexe de la présente méthode. Cette démarche, élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (6) et recommandée à l'unanimité par les participants à cet atelier, a été adoptée à titre de recommandation dans le cadre du Globally Harmonized System for the Classification of Chemical Substances (GHS) (système de classification des substances chimiques harmonisé à l'échelon mondial) (7). Bien que cette stratégie séquentielle ne fasse pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée avant d'entreprendre les essais *in vivo*. S'agissant de nouvelles substances, on préconise de suivre une démarche expérimentale par étapes pour obtenir des résultats scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant de la substance. En ce qui concerne les substances existantes dont les données sur l'effet corrosif ou irritant sont insuffisantes, on suppléera à ces dernières en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre démarche expérimentale ou la décision de ne pas procéder par étapes doivent être justifiés.

Si l'analyse de la valeur probante des résultats ne permet pas de déterminer l'effet corrosif ou irritant, on envisagera un essai *in vivo* compatible avec la démarche séquentielle (voir annexe).

▼B

1.2. DÉFINITIONS

L'irritation cutanée désigne l'apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'une substance d'essai durant une période de quatre heures au maximum.

La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'une substance d'essai durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au pâlissement de la peau, des zones d'alopecie totale et des escarres. Un examen histopathologique sera envisagé en cas de lésions douteuses.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Une seule dose de la substance d'essai est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleur aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation de la substance. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrant fortement sont définis dans un document cité en référence (8).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparation de l'essai in vivo

1.4.1.1. Sélection de l'espèce animale

On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

1.4.1.2. Préparation des animaux

Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

La fourrure de certaines souches de lapins est plus touffue par endroits et ce phénomène est plus marqué à certaines périodes de l'année. Ces plages à forte pilosité ne doivent pas recevoir la substance d'essai.

1.4.1.3. Conditions d'hébergement et d'alimentation

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (± 3 °C) pour les lapins. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

▼B1.4.2. **Mode opératoire**1.4.2.1. *Application de la substance d'essai*

La substance d'essai est appliquée sur une petite zone (environ 6 cm²) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, maintenue en place à l'aide d'un sparadrap non irritant. Si l'application directe est impossible (dans le cas de liquides ou de certaines pâtes, par exemple), la substance d'essai est d'abord appliquée sur la compresse de gaze, laquelle est ensuite placée sur la peau. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. Si la substance d'essai est déposée sur la compresse, celle-ci doit être fixée sur la peau de façon que la substance y soit répartie uniformément et entre bien en contact avec celle-ci. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler la substance d'essai.

Les substances liquides sont généralement testées à l'état non dilué. Si la substance d'essai est solide (elle peut être pulvérisée si nécessaire), il y a lieu de l'humidifier avec la plus petite quantité d'eau (ou au besoin avec un autre véhicule approprié) nécessaire à assurer un bon contact avec la peau. Lorsqu'on utilise un véhicule autre que l'eau, l'influence éventuelle du véhicule sur l'irritation de la peau par la substance d'essai doit être minimale.

À la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être de la substance d'essai restante, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme.

1.4.2.2. *Dose*

Une dose de 0,5 ml de liquide ou de 0,5 g de solide ou de pâte est appliquée sur la plage à tester.

1.4.2.3. *Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée in vivo sur un seul animal)*

Il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai in vivo sur un seul animal, surtout lorsqu'on pense que la substance risque d'être corrosive. Cette précaution obéit à la démarche expérimentale séquentielle (voir annexe 1).

Dès lors qu'une substance est jugée corrosive d'après l'analyse de la valeur probante des résultats, tout essai sur animal s'avère superflu. Pour la plupart des substances risquant d'être corrosives, il n'est généralement pas nécessaire de procéder à un essai in vivo. Toutefois, si l'on estime que les données disponibles ne sont pas assez convaincantes, on peut réaliser un essai limité sur un animal en suivant la procédure décrite ci-après. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction.

Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

▼B

Dans les cas où l'on s'attend à ce que la substance d'essai soit peut-être irritante, mais pas corrosive, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

1.4.2.4. *Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée in vivo sur des animaux supplémentaires)*

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

1.4.2.5. *Période d'observation*

La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

1.4.2.6. *Observations cliniques et cotation des réactions cutanées*

L'observation des signes d'érythème et d'œdème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau ci-après. Si la peau présente des lésions qui ne caractérisent pas une irritation ou une corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels qu'un dessèchement de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. L'examen histopathologiques est à envisager en cas de réactions équivoques.

La cotation des réactions cutanées est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions cutanées et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé (voir tableau ci-après). Un manuel illustré sur la cotation de l'irritation cutanée et d'autres lésions pourrait être utile (9). La cotation des réactions cutanées devrait faire l'objet d'une évaluation à l'aveugle.

2. **RÉSULTATS**

2.1. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude devraient être récapitulés dans un tableau joint au rapport d'essai final et couvrir tous les aspects énumérés au paragraphe 3.1.

▼B

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Le degré d'irritation cutanée devrait être évalué en considération de la gravité des lésions et de leur caractère réversible ou non. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. Ces cotes individuelles doivent plutôt être considérées comme des valeurs de référence, à évaluer en association avec toutes les autres observations effectuées au cours de l'étude.

L'évaluation des réactions d'irritation doit tenir compte de la réversibilité des lésions cutanées. Si des réactions, telles qu'une alopecie (sur une aire limitée), une hyperkératose, une hyperplasie et une desquamation, persistent jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours, il y a lieu de considérer la substance d'essai comme irritante.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo: analyse de la valeur probante des résultats disponibles avant l'essai, notamment des résultats de la démarche expérimentale séquentielle:

- description des données pertinentes livrées par des essais précédents,
- données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale,
- description des essais in vitro effectués, exposant le détail des procédures et les résultats obtenus avec les substances d'essai et de référence,
- justification de l'étude in vivo après analyse de la valeur probante des résultats disponibles.

Substance d'essai:

- données d'identification (par exemple, numéro CAS, source, pureté, impuretés connues, numéro de lot),
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité),
- s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Véhicule:

- identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé,
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos,
- nombre d'animaux de chaque sexe,
- poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai,
- âge des animaux au début de l'essai,
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

▼B

Conditions expérimentales:

- technique de préparation du site d'application,
- détails concernant la composition du timbre et la technique d'application de ce dernier,
- détails sur la préparation, l'application et l'enlèvement de la substance d'essai.

Résultats:

- tableau faisant apparaître, pour chaque animal et à chaque relevé, les cotes attribuées aux réactions d'irritation/corrosion observées,
- description de toutes les lésions observées,
- description circonstanciée de la nature et du degré d'irritation ou de corrosion observé, et de tout effet histopathologique,
- description de tout autre effet local néfaste (par exemple dessèchement de la peau) et des effets systémiques.

Discussion des résultats

4.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410-429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, p. 19-26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, p. 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No 15, «Skin Irritation», European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, p. 483-524.
- (5a) Méthode d'essai B.40. Corrosion cutanée.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

▼B

- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[peut être obtenu sur demande auprès du secrétariat de l'OCDE].

▼B*Tableau I***COTATION DES RÉACTIONS CUTANÉES****Formation d'érythème et d'escarres**

Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarres empêchant la cotation de l'érythème	4

Maximum possible: 4

Formation d'œdème

Pas d'œdème	0
(Œdème très léger (à peine perceptible)	1
(Œdème léger (pourtour de la zone œdémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
(Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
(Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4

Maximum possible: 4

Un examen histopathologique pourra être réalisé en cas de réaction équivoque.



ANNEXE

Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation inutile d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai *in vivo*, on évaluera toutes les informations relatives à l'éventuel pouvoir corrosif/irritant d'une substance sur la peau. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer une substance d'essai quant à son pouvoir irritant ou corrosif, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à une analyse de la valeur probante des résultats et l'adoption d'une démarche expérimentale séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais *in vivo*, surtout lorsqu'il est probable que la substance va engendrer de graves effets.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des substances à l'aide d'une analyse de la valeur probante des résultats, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études cutanées *in vivo*, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales pertinentes. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La démarche expérimentale exposée dans cette annexe a été élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (1) avant d'être entérinée et complétée dans le cadre du système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques (Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adopté par la vingt-huitième réunion conjointe du comité sur les produits chimiques et du groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie, en novembre 1998 (2).

Si cette démarche expérimentale séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur la peau. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai *in vivo* et récapitule les facteurs à prendre en considération avant d'entamer l'essai. La démarche indique comment évaluer les données existantes relatives aux propriétés irritantes ou corrosives des substances et présente les différentes étapes permettant d'obtenir des données pertinentes sur les substances qui réclament d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiées. Elle recommande également, dans certaines circonstances, la réalisation d'essais *in vitro* ou *ex vivo* d'irritation et de corrosion cutanées, validés et acceptés.

DESCRIPTION DE LA STRATÉGIE D'ÉVALUATION ET D'ESSAI

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (figure), il faut évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais cutanés *in vivo*. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations significatives (par exemple un pH extrême), la totalité des informations existantes doit être prise en considération. L'analyse de la valeur probante des résultats portera sur toutes les données pertinentes concernant les effets de la substance en question, ou de ses analogues; elle débouchera sur une décision qui devra être justifiée. Il conviendra d'accorder une place prépondérante aux données se rapportant aux humains et aux animaux, et d'examiner ensuite les résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* sur la substance. Les essais *in vivo* de substances corrosives devront être évités chaque fois que cela est possible. Les facteurs pris en compte dans la démarche expérimentale sont repris ci-après:

▼B

Évaluation des données existantes sur les humains et les animaux (étape 1). Les données existantes sur l'être humain, par exemple des études cliniques ou sur les conditions de travail et des rapports sur des cas relevant de ces disciplines, et/ou les résultats d'essais sur animaux, par exemple des essais de toxicité par exposition cutanée unique ou répétée, sont à examiner en premier, car ils livrent des informations directement liées aux effets sur la peau. Les substances dont le pouvoir irritant ou corrosif est avéré et celles dont le caractère non corrosif et non irritant a été clairement démontré ne doivent pas faire l'objet d'études in vivo.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (étape 2). Le cas échéant, les résultats d'essais sur des substances structurellement proches doivent être pris en considération. S'il existe suffisamment de données relatives aux humains et/ou aux animaux sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant, on peut supposer que la substance étudiée provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester la substance. Des résultats négatifs lors d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances ne constituent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'une substance dans le cadre de la démarche expérimentale séquentielle. On déterminera le pouvoir corrosif ou irritant pour la peau en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique (étape 3). Les substances présentant des valeurs de pH extrêmes, par exemple $< 2,0$ ou $> 11,5$, sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice décisif quant au caractère corrosif d'une substance, son pouvoir tampon doit également entrer en ligne de compte (3) (4). Si le pouvoir tampon donne à penser que la substance peut ne pas être corrosive pour la peau, cette hypothèse demande à être confirmée par un autre essai, de préférence un essai in vitro ou ex vivo validé et accepté (voir étapes 5 et 6).

Toxicité cutanée (étape 4). S'il est prouvé qu'une substance chimique est très toxique par voie cutanée, une étude d'irritation ou de corrosion cutanée risque d'être impossible à réaliser in vivo, la quantité de substance d'essai normalement appliquée pouvant dépasser la dose très toxique et entraîner ainsi la mort des animaux ou les faire terriblement souffrir. En outre, lorsque des études de toxicité cutanée ont déjà été menées sur des lapins albinos jusqu'à la dose limite de 2 000 mg/kg de poids corporel, ou au-delà, et qu'aucune irritation ou corrosion cutanées n'ont été constatées, il n'est plus forcément nécessaire d'effectuer un essai supplémentaire d'irritation ou de corrosion cutanée. Il convient de faire attention à plusieurs aspects lorsqu'on évalue la toxicité cutanée aiguë à partir d'études antérieures. À titre d'exemple, les informations rapportées sur les lésions cutanées peuvent être incomplètes. Il se peut que les essais et les observations aient été effectués sur une autre espèce que le lapin, or, la sensibilité aux substances est très variable d'une espèce à l'autre. De même, la forme sous laquelle la substance d'essai a été appliquée sur les animaux peut ne pas convenir à l'évaluation de l'irritation et de la corrosion cutanées [par exemple la dilution des substances (5)]. Néanmoins, lorsque des études bien conçues de toxicité cutanée ont été correctement menées sur le lapin, leurs résultats négatifs peuvent être considérés comme une démonstration suffisante du caractère non irritant ni corrosif de la substance.

Résultats des essais in vitro ou ex vivo (étapes 5 et 6). Les substances dont le pouvoir fortement irritant ou corrosif a été mis en évidence par un essai in vitro ou ex vivo validé et accepté (6) (7), conçu pour évaluer ces effets particuliers, ne doivent pas être testées sur des animaux. Il est en effet très vraisemblable que ces substances produiront des effets semblables in vivo.

▼B

Essai in vivo sur des lapins (étapes 7 et 8). Si la décision d'effectuer une étude in vivo a été prise sur la base d'une analyse de la valeur des résultats, celle-ci doit débiter par un essai initial réalisé sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que la substance est corrosive pour la peau, il ne faut pas poursuivre les essais. Si l'essai initial ne montre aucun effet corrosif, il y a lieu de confirmer l'absence de réaction ou une réaction d'irritation sur un ou deux animaux supplémentaires exposés à la substance durant quatre heures. Lorsque l'essai initial fait apparaître un effet irritant, l'essai confirmatoire doit être conduit sur un mode séquentiel, ou par l'exposition simultanée des deux animaux supplémentaires.

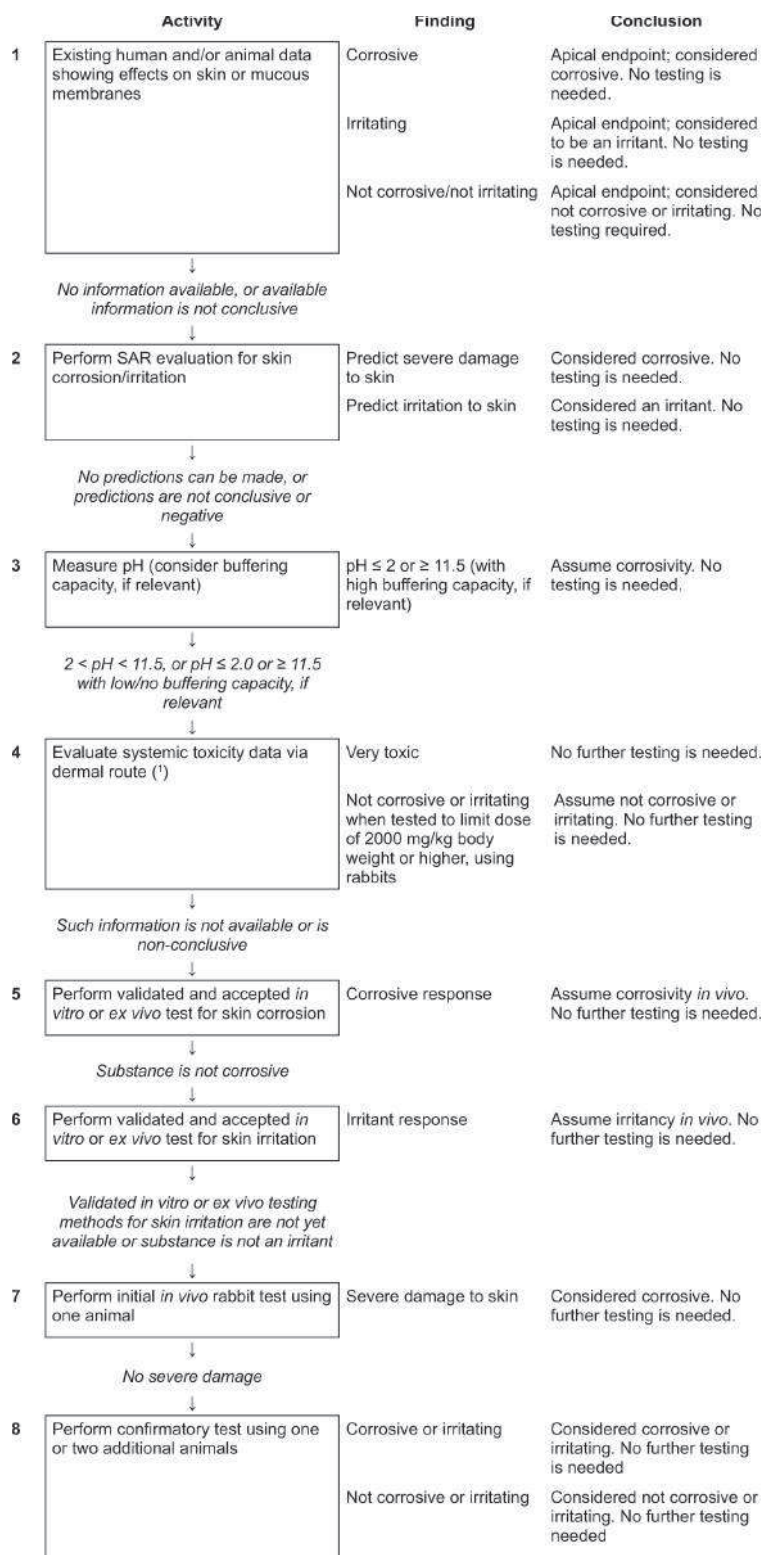
BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Liebsch, M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, p. 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1), p. 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.
- (6) Méthode d'essai B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, p. 483-524.

▼B

Figure

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION CUTANÉES



⁽¹⁾ can be considered before Steps 2 and 3.

«B.5 EFFET IRRITANT/CORROSIF AIGU SUR LES YEUX

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 405 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement réexaminées pour vérifier qu'elles intègrent les meilleures données scientifiques disponibles. Les précédents réexamens de cette méthode d'essai ont mis l'accent sur les possibilités d'éviter l'utilisation inutile des animaux de laboratoire afin de répondre aux préoccupations relatives au bien-être des animaux, moyennant l'évaluation préalable de toutes les informations existantes se rapportant aux produits chimiques d'essai. La ligne directrice 405 (adoptée en 1981 et mise à jour en 1987, 2002 et 2012) recommande d'analyser les résultats déjà disponibles en se fondant sur le poids de la preuve (1) avant d'envisager l'essai in vivo de l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux décrit dans cette ligne directrice. Il est conseillé de combler le manque de données par des essais séquentiels (2) (3). La stratégie d'essai inclut la réalisation d'essais in vitro validés et acceptés et est exposée dans un supplément à la présente méthode d'essai. Aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) (1), une stratégie d'essai intégrée figure également dans le guide pertinent de l'ECHA (21). Les essais sur les animaux ne seront réalisés que s'ils s'avèrent nécessaires après examen des méthodes alternatives disponibles et mise en œuvre de celles jugées appropriées. À l'heure où la présente méthode d'essai est mise à jour, il existe encore des cas où le recours à cette méthode d'essai demeure indispensable ou est exigé par certains cadres réglementaires.

La mise à jour la plus récente concerne essentiellement l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques sans changer le concept de base et la structure de la ligne directrice. L'ICCVAM (2) et un groupe international d'experts scientifiques indépendants ont examiné l'utilité et les limites d'un recours en routine à des anesthésiques topiques, des analgésiques systémiques et des effets mesurés éthiquement acceptables lors d'essais in vivo d'irritation oculaire (12). Ils ont conclu que l'utilisation d'anesthésiques topiques et d'analgésiques systémiques permettait d'éviter la majeure partie, voire la totalité, de la douleur et de la détresse des animaux sans modifier le résultat de l'essai, et recommandé que ces substances soient systématiquement utilisées. La présente méthode d'essai tient compte des conclusions de cet examen. Il convient donc que les anesthésiques topiques, analgésiques systémiques et effets mesurés éthiquement acceptables soient utilisés en routine dans le cadre des essais in vivo de l'effet irritant/corrosif aigu sur l'œil. Toute exception à cet égard devra être justifiée. Les raffinements décrits dans cette méthode allégeront considérablement ou éviteront la douleur et la détresse chez les animaux dans la plupart des cadres expérimentaux qui exigent encore un essai de sécurité oculaire in vivo.

Une gestion préventive et équilibrée de la douleur comprend: (i) un prétraitement en routine avec un anesthésique topique (p. ex. proparacaine ou tétracaine) et un analgésique systémique (p. ex. buprénorphine), (ii) un programme de traitement post-exposition en routine avec un analgésique systémique (p. ex. buprénorphine et méloxicam), (iii) un programme d'observation, de suivi et de consignation des signes cliniques de douleur et/ou de détresse chez les animaux, et (iv) un programme d'observation, de suivi et de consignation de la nature, de la gravité et de la progression de toutes les lésions oculaires. D'autres détails sont fournis dans les procédures mises à jour décrites ci-dessous. Après l'exposition au produit chimique d'essai, aucun anesthésique ou analgésique topique supplémentaire ne sera administré, de manière à éviter toute interférence avec l'essai. Les analgésiques dotés de propriétés anti-inflammatoires (comme le méloxicam) ne feront pas l'objet d'une application locale, et les doses systémiques employées ne devront pas perturber les effets sur l'œil.

Les définitions sont données dans l'appendice de la présente méthode d'essai.

(1) Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.

(2) US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives, aux États-Unis)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Dans le souci de concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* avant d'avoir évalué, par une analyse du poids de la preuve, toutes les données relatives au caractère potentiellement corrosif ou irritant du produit chimique pour les yeux. Ces données comprennent les résultats d'études existantes menées sur des humains et/ou des animaux de laboratoire, des données établissant l'effet corrosif ou irritant pour l'œil d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (4) (5), et des résultats d'essais *in vitro* ou *ex vivo* de corrosion cutanée et de corrosion/irritation oculaires validés et acceptés (6) (13) (14) (15) (16) (17). Les études peuvent avoir été conduites avant, ou à la suite de, l'analyse du poids de la preuve.

Pour certains produits chimiques, une telle analyse peut faire valoir la nécessité de mener des études *in vivo* du pouvoir corrosif/irritant pour l'œil du produit chimique. Le cas échéant, avant d'envisager un essai oculaire *in vivo*, il est préférable d'effectuer d'abord un essai *in vitro* et/ou *in vivo* de la corrosion cutanée induite par le produit chimique, et d'évaluer ces résultats conformément à la stratégie d'essai séquentielle de la méthode d'essai B.4 (7) ou à la stratégie d'essai intégrée décrite dans le guide de l'ECHA (21).

Une stratégie d'essai de type séquentiel, comportant des essais *in vitro* ou *ex vivo* de corrosion/irritation de l'œil validés, est décrite dans un supplément à la présente méthode d'essai et, aux fins de REACH, dans le guide de l'ECHA (21). Il est recommandé d'appliquer une telle stratégie d'essai avant de procéder à des essais *in vivo*. Pour les produits chimiques nouveaux, une stratégie d'essai par étapes est préconisée pour obtenir des données scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant du produit chimique. En ce qui concerne les produits chimiques existants pour lesquels les données sur l'effet corrosif ou irritant sur la peau et les yeux sont insuffisantes, il est possible de suppléer ces lacunes en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre stratégie d'essai ou la décision de ne pas procéder par étapes fait l'objet de justification.

PRINCIPE DE L'ESSAI *IN VIVO*

Après l'administration d'un analgésique systémique et l'induction d'une anesthésie topique adaptée, le produit chimique d'essai est appliqué en une seule dose sur un des yeux de l'animal d'expérience, l'œil non traité servant de témoin. On évalue le score de l'irritation ou de la corrosion oculaires en cotant la gravité des lésions affectant la conjonctive, la cornée et l'iris, à intervalles déterminés. Les autres réactions de l'œil et les troubles systémiques sont également décrits de manière à fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets.

Les animaux qui présentent des signes de douleur et/ou de détresse aiguës à tout stade de l'essai, ou des lésions correspondant aux effets mesurés éthiquement acceptables décrits dans la présente méthode d'essai (voir paragraphe 26) seront euthanasiés, et ces symptômes seront à prendre en compte dans l'évaluation du produit chimique d'essai. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et pris de fortes douleurs sont exposés dans un document d'orientation de l'OCDE (8).

PRÉPARATION DE L'ESSAI *IN VIVO*

Choix des espèces

On choisira de préférence des lapins albinos et de jeunes adultes sains seront utilisés. L'utilisation d'une autre espèce ou souche fait l'objet de justification.

Préparation des animaux

Les deux yeux de chaque animal susceptible de participer à l'essai sont examinés dans les 24 heures précédant le début de l'essai. Les animaux qui présentent des signes d'irritation oculaire, des défauts oculaires ou une lésion de la cornée seront écartés.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (± 3 °C) pour les lapins. S'il convient que l'humidité relative atteigne au moins 30 % sans excéder de préférence 70 %, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. L'éclairage est artificiel, avec une séquence alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. On évitera les éclairages trop intenses. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

MODE OPÉRATOIRE

Utilisation d'anesthésiques topiques et d'analgésiques systémiques

Les procédures suivantes sont recommandées pour réduire ou éviter la douleur et la détresse dans le cadre des essais de sécurité pour l'œil. On pourra faire appel à des procédures de remplacement dont il est avéré qu'elles sont aussi efficaces ou plus efficaces pour réduire ou éviter la douleur et la détresse des animaux.

- Soixante minutes avant l'application du produit chimique d'essai (APCE), les animaux reçoivent 0,01 mg/kg de buprénorphine par injection sous-cutanée (ISC) afin d'atteindre un niveau thérapeutique d'analgésie systémique. La buprénorphine et d'autres analgésiques opioïdes similaires administrés de façon systémique ne sont pas connus pour, ou suspectés de, modifier les lésions oculaires (12).
- Cinq minutes avant l'APCE, une ou deux gouttes d'anesthésique oculaire topique (p. ex. hydrochlorure de proparacaine ou de tétracaine à 0,5 %) sont appliquées sur chaque œil. Les anesthésiques topiques dénués d'agents conservateurs sont recommandés afin d'éviter toute interférence avec l'essai. L'œil de chaque animal non traité avec le produit chimique d'essai, mais qui reçoit l'anesthésique topique, joue le rôle de témoin. Si l'on suppose que le produit chimique d'essai peut entraîner une douleur et une détresse intenses, elle ne sera normalement pas testée *in vivo*. Néanmoins, quand un doute subsiste ou dans les cas où un tel essai est exigé, il convient d'envisager des administrations supplémentaires d'anesthésique topique toutes les 5 minutes, en amont de l'APCE. Les expérimentateurs doivent toutefois savoir que les applications multiples d'anesthésiques topiques sont susceptibles d'accroître légèrement la gravité des lésions induites par la substance chimique et/ou le délai de réversibilité de ces lésions.
- Huit heures après l'APCE, on injecte par voie sous-cutanée 0,01 mg/kg de buprénorphine et 0,5 mg/kg de méloxicam afin de maintenir l'analgésie systémique à un niveau thérapeutique. Bien qu'aucune donnée ne suggère d'effet anti-inflammatoire sur l'œil quand le méloxicam est injecté par voie sous-cutanée une fois par jour, on attendra au moins huit heures après l'APCE pour administrer ce produit afin d'éviter une interférence éventuelle avec l'essai (12).
- Après ce délai de 8 heures, on administre 0,01 mg/kg de buprénorphine par ISC toutes les 12 heures, parallèlement à un traitement au méloxicam à 0,5 mg/kg par ISC toutes les 24 heures, jusqu'à ce qu'une régression des lésions oculaires soit observée et qu'aucun signe clinique de douleur et de détresse ne se manifeste. Ces analgésiques sont disponibles dans des formes à libération prolongée, qui peuvent être envisagées pour réduire la fréquence d'administration d'analgésique.
- Un traitement analgésique «de secours» est effectué immédiatement après l'APCE lorsque l'analgésique et l'anesthésique topique administrés au préalable se révèlent inadaptés. Si un animal montre des signes de douleur ou de détresse en cours d'essai, une dose «de secours» de buprénorphine de 0,03 mg/kg sera immédiatement injectée par voie sous-cutanée puis répétée toutes les 8 heures (intervalle minimum), si nécessaire; cette posologie remplace les doses de 0,01 mg/kg par ISC toutes les 12 heures. La dose «de secours» de buprénorphine sera accompagnée de méloxicam à 0,5 mg/kg par ISC toutes les 24 heures, la première injection n'intervenant toutefois pas dans les 8 heures qui suivent l'APCE.

Application du produit chimique d'essai

L'expérimentateur introduit le produit chimique d'essai dans le cul-de-sac conjonctival d'un des deux yeux de chaque animal, après avoir délicatement écarté la paupière inférieure du globe oculaire. Il ramène ensuite délicatement les deux paupières l'une contre l'autre et les maintient dans cette position pendant environ une seconde afin d'éviter toute perte de substance. L'autre œil, qui ne subit pas de traitement, sert de témoin.

Irrigation

Il convient de ne pas laver les yeux des animaux traités pendant au moins 24 heures après l'instillation du produit chimique d'essai, à moins que celui-ci soit à l'état solide (voir paragraphe 18) ou déclenche immédiatement des effets corrosifs ou irritants. Au besoin, un lavage pourra être effectué à l'issue de ce délai.

L'utilisation d'un groupe d'animal satellite pour étudier l'influence du lavage n'est pas indiquée, à moins qu'elle ne se justifie d'un point de vue scientifique. Le cas échéant, on utilisera deux lapins. Les conditions du lavage sont décrites minutieusement: par exemple le moment du lavage, la composition et la température de la solution ophtalmique, la durée, le volume et la vitesse d'application.

Niveau de dose

(1) Essais sur des liquides

Pour les liquides, on utilise une dose de 0,1 ml. Il convient d'éviter d'instiller le produit chimique directement dans l'œil avec un vaporisateur à pression; il est préférable d'expulser d'abord le produit chimique dans une fiole, d'en prélever 0,1 ml et de l'instiller dans l'œil.

(2) Essais sur des solides

Dans le cas des solides, pâtes ou substances particulières, la quantité utilisée a un volume de 0,1 ml ou un poids ne dépassant pas 100 mg. Le produit chimique d'essai sera broyé finement. Il convient de mesurer le volume de la substance solide après l'avoir légèrement tassée, par exemple en tapotant le récipient de mesure. Si le produit chimique d'essai solide n'a pas encore été évacué de l'œil de l'animal par des mécanismes physiologiques au premier moment d'observation, à savoir une heure après le traitement, l'œil peut être rincé à l'aide d'une solution saline ou à l'eau distillée.

(3) Essais sur des aérosols

Il est recommandé de prélever une dose du contenu de tous les vaporisateurs à pression et aérosols avant de l'instiller dans l'œil. La seule exception concerne les produits chimiques conditionnés en bombes aérosol sous pression, qui sont impossibles à recueillir préalablement à l'instillation car ils se vaporisent. Dans ce cas, l'expérimentateur maintient l'œil de l'animal ouvert et administre le produit chimique à tester en un seul jet d'environ une seconde, émis à 10 cm et directement en face de l'œil. Cette distance peut être modulée en fonction de la pression du jet et de sa composition. Il convient de veiller à ce que la pression du jet n'endommage pas l'œil. Dans certains cas, il pourra être nécessaire d'évaluer l'ampleur des dégâts «mécaniques» risquant d'être causés à l'œil par la force du jet.

La dose d'aérosol peut être estimée grâce à une simulation de l'application menée comme suit: le produit chimique est projeté sur du papier pour pesée à travers une ouverture de la taille d'un œil de lapin placée directement devant le papier. L'augmentation du poids du papier donne une idée approximative de la quantité administrée à l'œil de lapin. Pour un produit volatile, la dose peut être estimée à partir du poids du récipient (dans lequel elle est contenue) avant et après utilisation.

Essai initial (essai *in vivo* de l'effet irritant/corrosif sur les yeux mené sur un seul animal)

Il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai *in vivo* sur un seul animal (voir le supplément à la présente méthode d'essai: Stratégie d'essai séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion oculaires). Les observations qui en découlent doivent permettre de déterminer la gravité et la réversibilité des lésions avant de mettre en œuvre un essai de confirmation avec un animal supplémentaire.

Si les résultats de cet essai, mené selon la procédure décrite, indiquent que le produit chimique est corrosif ou fortement irritant pour l'œil, il n'y a pas lieu de mener d'autres essais d'irritation oculaire.

Essai de confirmation (essai d'irritation oculaire *in vivo* conduit sur des animaux supplémentaires)

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif ou fortement irritant, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur un ou deux animaux supplémentaires. Si l'essai initial produit un effet irritant, il est recommandé de conduire l'essai de confirmation sur un mode séquentiel en n'utilisant qu'un seul animal à la fois, plutôt que d'exposer les deux animaux simultanément. Si le deuxième animal manifeste des signes de corrosion ou de forte irritation, l'essai s'arrête là. Si les résultats de l'essai sur le deuxième animal suffisent à déterminer la catégorie de danger de la substance, l'essai s'arrête là.

Période d'observation

La durée de la période d'observation doit être suffisante pour permettre d'évaluer entièrement l'ampleur et la réversibilité des effets observés. Il convient cependant de mettre un terme à l'essai dès qu'un animal manifeste des signes de détresse ou de douleur aiguë (8). Pour déterminer la réversibilité des effets, les animaux sont normalement observés durant 21 jours après l'exposition au produit chimique d'essai. Si la réversibilité est constatée avant ce délai, l'expérience prend fin à ce moment-là.

Observations cliniques et cotation de la gravité des réactions oculaires

Les yeux font l'objet d'un examen complet pour repérer d'éventuelles lésions oculaires une heure après l'APCE, puis cette procédure est répétée au moins une fois par jour. Les trois premiers jours qui suivent l'exposition, on examinera les animaux plusieurs fois par jour afin de pouvoir mettre un terme à l'essai en temps opportun, s'il y a lieu. Les animaux sont soumis à des examens de routine tout au long de l'essai pour rechercher des signes cliniques de douleur et/ou de détresse (p. ex. coups de patte ou frottements de l'œil répétés, cilleusement excessif, larmolement excessif) (9) (10) (11), au moins deux fois par jour à six heures d'intervalle minimum, ou plus fréquemment si besoin est. Ces examens sont nécessaires pour (i) évaluer correctement les signes de douleur et de détresse des animaux afin d'établir la nécessité d'augmenter le dosage des analgésiques en conséquence et (ii) déterminer si les effets mesurés éthiquement acceptables sont atteints, de manière à décider en connaissance de cause d'euthanasier ou non les animaux et veiller à ce que les décisions d'euthanasier soient prises en temps voulu. Pour faciliter la détection et la mesure des lésions oculaires et déterminer si les effets observés éthiquement acceptables motivant l'euthanasie ont été atteints, on utilisera une coloration à la fluorescéine en routine ainsi qu'un biomicroscope (lampe à fente), si nécessaire (p. ex. pour évaluer la profondeur de la lésion en cas d'ulcération cornéenne). Des photographies numériques des lésions observées pourront être collectées à titre de référence et pour garder une trace permanente attestant l'étendue de la lésion oculaire. Les animaux ne seront maintenus dans l'essai que le temps nécessaire pour obtenir un résultat définitif. Ceux qui manifestent des signes de douleur ou de détresse aiguë sont euthanasiés immédiatement, et ces symptômes sont à prendre en compte dans l'évaluation du produit chimique d'essai.

Il convient également d'euthanasier les animaux qui présentent les lésions oculaires suivantes à la suite de l'instillation (voir le tableau 1 pour une description des scores des lésions): une perforation de la cornée ou une ulcération profonde de la cornée associée à un staphylome; la présence de sang dans la chambre antérieure de l'œil; une opacité cornéenne de niveau 4; l'absence de réflexe photomoteur (réaction iridienne de niveau 2) durant 72 heures; l'ulcération de la membrane conjonctivale; une nécrose des conjonctives ou de la membrane nictitante; ou un décollement du tissu nécrosé. Et ce, parce que ces lésions sont généralement irréversibles. Il est par ailleurs recommandé de considérer les lésions oculaires suivantes comme des effets mesurés éthiquement acceptables, dont la survenue motive l'arrêt d'un essai avant la période d'observation de 21 jours prévue. On estime que ces lésions en annoncent d'autres symptomatiques d'un effet corrosif ou fortement irritant, ou qui ne seront que partiellement réversibles dans le délai d'observation de 21 jours: lésions très profondes (p. ex. une ulcération cornéenne qui dépasse les couches superficielles du stroma), destruction du limbe > 50 % (traduite par un blanchiment du tissu conjonctival) et infection oculaire aiguë (écoulement purulent). Une vascularisation de la surface cornéenne (c'est-à-dire un pannus) associée à une surface colorée à la fluorescéine qui ne diminue pas au fil des examens quotidiens et/ou à l'absence de réépithélialisation 5 jours après l'application du produit chimique d'essai peuvent aussi constituer un faisceau de critères utiles pour justifier la décision clinique de mettre un terme à l'essai prématurément. Cependant, chacun de ces résultats pris isolément ne suffit pas à motiver l'arrêt prématuré de l'essai. Dès que des effets graves sur l'œil sont observés, il convient de faire appel à un vétérinaire traitant ou spécialisé dans les animaux de laboratoire, ou à du personnel formé à identifier les lésions cliniques, pour mener un examen clinique permettant de juger si l'association de ces réactions implique un arrêt prématuré de l'essai. On attribuera un score aux réactions oculaires (des conjonctives, de la cornée et de l'iris) 1, 24, 48 et 72 heures après l'application du produit chimique d'essai, et les résultats seront consignés (tableau 1). Les animaux qui ne présentent pas de lésions oculaires peuvent être écartés, mais seulement à partir du quatrième jour suivant l'instillation. Les animaux dont les lésions ne sont pas sévères demeurent en observation jusqu'à la disparition de ces lésions, ou pendant 21 jours, après quoi l'essai prend fin. Ces observations sont effectuées et consignées au moins à 1, 24, 48, 72 heures, puis 7, 14 et 21 jours après l'APCE afin de déterminer l'état des lésions ainsi que leur réversibilité ou leur irréversibilité. Il est parfois nécessaire de rapprocher les examens pour déterminer s'il convient d'euthanasier un animal pour des raisons éthiques ou de l'écarter de l'essai du fait de résultats négatifs.

Le niveau des lésions oculaires (tableau 1) est consigné à chaque examen. Toutes les autres lésions oculaires (p. ex. pannus, coloration, modifications de la chambre antérieure) et les troubles systémiques sont également signalés.

Pour examiner les réactions, on peut s'aider d'une loupe binoculaire, d'une lampe à fente portable, d'un biomicroscope ou d'un autre appareil approprié. Après l'enregistrement des observations effectuées à la vingt-quatrième heure, l'examen des yeux peut se poursuivre à la fluorescéine.

L'attribution de score aux réactions oculaires est inévitablement subjective. L'harmonisation de l'attribution de scores aux réactions oculaires et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de score utilisé.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Évaluation des résultats

Les scores d'irritation oculaire doivent être évalués en considération de la nature et de la gravité des lésions ainsi que de leur caractère réversible ou non. Les scores individuels ne sont pas un critère absolu de propriétés irritantes d'un produit chimique, car d'autres effets du produit chimique sont également évalués. En revanche, les scores individuels ont une valeur de référence et ne sont significatifs que lorsqu'ils sont étayés par une description et une évaluation complètes de toutes les observations.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo: analyse fondée sur le poids de la preuve des résultats d'essais préexistants, notamment ceux qui procèdent de la stratégie d'essai séquentielle:

- description des résultats pertinents d'essais précédents;
- données obtenues à chaque étape de la stratégie d'essai;
- description des essais effectués *in vitro* détaillant les procédures et mentionnant les résultats obtenus avec le produit chimique d'essai et de référence;
- description de l'étude d'irritation/corrosion cutanée menée *in vivo* mentionnant les résultats obtenus;
- comment l'analyse fondée sur le poids de la preuve des résultats disponibles a débouché sur la décision de conduire l'étude *in vivo*.

Produit chimique d'essai:

- données d'identification (par exemple nom chimique et si possible numéro CAS, pureté, impuretés connues, source, numéro de lot);
- état physique et propriétés physico-chimiques (p. ex., pH, volatilité, solubilité, stabilité, réactivité avec l'eau);
- s'il s'agit d'un mélange, les composants sont identifiés, et les données d'identification des substances constituant le mélange (par exemple les noms et, s'ils sont disponibles, les numéros CAS) et leurs concentrations sont fournies;
- dose appliquée.

Véhicule:

- identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;
- âge de chaque animal au début de l'essai;
- nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes d'essai et témoin (le cas échéant);
- poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Anesthésiques et analgésiques

- doses d'anesthésiques topiques et d'analgésiques systémiques administrés, et chronologie d'administration;
- si on a eu recours à un anesthésique local: identification, pureté, type et interaction potentielle avec le produit chimique d'essai.

Résultats:

- description de la méthode utilisée pour coter l'irritation à chaque moment d'observation (p. ex. lampe à fente portable, biomicroscope, fluorescéine);
- présentation sous forme de tableaux des réactions d'irritation ou de corrosion relevées chez chaque animal et à chaque moment d'observation jusqu'à la fin de la participation de chaque animal à l'essai;
- description circonstanciée du degré et de la nature de l'irritation ou de la corrosion observées;
- description de toute autre lésion notée dans l'œil (p. ex. vascularisation, formation d'un pannus, adhésions, coloration);
- description des effets non oculaires locaux et des troubles systémiques, enregistrement des signes cliniques de douleur et de détresse, photographies numériques et observations histopathologiques, le cas échéant.

*Discussion des résultats***Interprétation des résultats**

L'extrapolation à l'humain des résultats d'études d'irritation oculaire menées sur des animaux de laboratoire n'est valable que dans une certaine mesure. Dans bien des cas, le lapin albinos est plus sensible que l'espèce humaine aux substances irritantes ou corrosives pour l'œil.

Lors de l'interprétation des résultats, il faut savoir reconnaître une irritation consécutive à une infection secondaire, laquelle ne devra pas être prise en compte.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Barratt, M.D. et autres (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.
- (2) de Silva, O. et autres (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, *Food Chem. Toxicol* 35, 159 — 164.
- (3) Worth A.P. et Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161 — 177.
- (4) Young, J.R. et autres (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227 — 231.
- (6) Fentem et autres (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity, 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Chapitre B.4 de la présente annexe, *Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée*.
- (8) OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n° 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, *Lab Animal*. Mai/juin: 20-36.
- (10) Conseil national de la recherche des États-Unis (NRC) (2008), *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*, Washington, DC: National Academies Press.
- (11) Conseil national de la recherche des États-Unis (NRC) (2009), *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*, Washington, DC: National Academies Press.

- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

Disponible à l'adresse <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>

- (13) Chapitre B.40 de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET)*.

- (14) Chapitre B.40 bis de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine*.

- (15) OCDE (2006), *Essai n° 435: Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE. doi: [10.1787/9789264067325-fr](https://doi.org/10.1787/9789264067325-fr)

- (16) Chapitre B.47 de la présente annexe, Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.

- (17) Chapitre B.48 de la présente annexe, Méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.

- (18) U.S. EPA (2003), *Label Review Manual: 3rd Edition*. EPA737-B-96-001, Washington, DC: Agence de protection de l'environnement des États-Unis.

- (19) ONU (2011), *Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH)*, quatrième édition révisée, New York & Genève: Publications des Nations Unies.

- (20) CE (2008), *Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006*, Journal Officiel des Communautés Européennes L353, 1-1355.

- (21) ECHA Guide des exigences d'information et évaluation de la sécurité chimique, Chapitre R.7a: Informations spécifiques aux effets.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Tableau 1

Cotation des lésions oculaires

Cornée	Score
Opacité: degré de densité (les observations porteront sur les zones les plus denses) (*)	
Pas d'ulcération ni d'opacité	0
Zones d'opacité (autres qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses; détails de l'iris nettement visibles	1
Zone translucide aisément discernable; détails de l'iris légèrement masqués	2
Zone nacrée; détails de l'iris complètement invisibles; dimension de la pupille à peine discernable	3

Cornée	Score
Cornée opaque; iris non discernable à travers l'opacité	4
Maximum possible: 4	
Iris	
Normal	0
Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctives injectées; iris réactif à la lumière (une réaction lente est considérée positive)	1
Hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	2
Maximum possible: 2	
Conjonctives	
Rougeur (s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, mais pas à la cornée ni à l'iris)	
Normal	0
Hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	1
Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins difficilement discernables les uns des autres	2
Coloration rouge soutenu diffuse	3
Maximum possible: 3	
Chémosis	
Tuméfaction (s'applique aux paupières et/ou aux membranes nictitantes)	
Normal	0
Tuméfaction légèrement supérieure à la normale	1
Tuméfaction patente avec éversion partielle des paupières	2
Tuméfaction avec paupières à demi closes	3
Tuméfaction avec paupières plus qu'à demi closes	4
Maximum possible: 4	

(*) L'étendue de l'opacité cornéenne est précisée

Appendice

DÉFINITIONS

Réserve acide/alcaline: pour les préparations acides, quantité (g) d'hydroxyde de sodium/100 g de préparation nécessaire pour obtenir un pH déterminé. Pour les préparations basiques, il s'agit de la quantité (g) d'hydroxyde de sodium qui équivaut à la masse (g) d'acide sulfurique/100 g de préparation nécessaire pour obtenir un pH déterminé (Young et al. 1988).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Substance non irritante: substance qui n'est pas classée comme irritant oculaire au sens des catégories I, II ou III de l'EPA, des catégories 1, 2, 2A, ou 2B du SGH ou de la catégorie 1 ou 2 de l'UE (17) (18) (19).

Produit chimique corrosif pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire au sens de la catégorie 1 du SGH, de la catégorie 1 de l'EPA ou de la catégorie 1 de l'UE (17) (18) (19).

Produit chimique irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant une modification réversible de l'œil; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire au sens des catégories II ou III de l'EPA, des catégories 2, 2A ou 2B du SGH ou de la catégorie 2 de l'UE(17) (18) (19).

Produit chimique fortement irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions tissulaires de l'œil qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou entraînent une dégradation sévère de la vision; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire au sens de la catégorie 1 du SGH, de la catégorie 1 de l'EPA ou de la catégorie I de l'UE (17) (18) (19).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Stratégie à plusieurs niveaux: stratégie d'essai séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Poids de la preuve: procédé consistant à prendre en compte les forces et les faiblesses de divers éléments d'information pour aboutir à une conclusion concernant les dangers potentiels d'un produit chimique et étayer cette conclusion.

SUPPLÉMENT À LA MÉTHODE D'ESSAI B.5 ⁽¹⁾**DÉMARCHE EXPERIMENTALE SEQUENTIELLE POUR LES ESSAIS D'IRRITATION ET DE CORROSION OCULAIRES****Généralités**

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation abusive d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai *in vivo*, on évaluera toutes les informations relatives à l'éventuel effet corrosif/irritant d'un produit chimique sur les yeux. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer le produit chimique d'essai quant à son pouvoir irritant ou corrosif pour les yeux, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à l'analyse du poids de la preuve et l'adoption d'une stratégie d'essai séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais *in vivo*, surtout si le produit chimique risque d'engendrer des réactions violentes.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des produits chimiques pour les yeux en se fondant sur le poids de la preuve, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études oculaires *in vivo*, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales pertinentes. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La stratégie d'essai initiale décrite dans le présent supplément a été conçue lors d'un atelier de l'OCDE (1). Elle a ensuite été confirmée et étendue dans le Système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques, adoptée par la vingt-huitième Réunion conjointe du Comité sur les produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques en novembre 1998 (2), et mise à jour par un groupe d'experts de l'OCDE en 2011.

Si cette stratégie d'essai séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.5, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur les yeux. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique pour les essais *in vivo* dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai *in vivo* et récapitule les facteurs qui devraient être examinés avant d'entamer l'essai. La stratégie d'essai séquentielle indique comment évaluer les données existantes relatives aux propriétés irritantes ou corrosives des produit chimique pour l'œil en se fondant sur le poids de la preuve, et présente une stratégie à plusieurs niveaux permettant d'obtenir des données pertinentes sur les produits chimiques qui réclament d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiés. Cette démarche prescrit également de commencer par conduire des essais *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés, puis, dans certaines circonstances, d'effectuer les études d'irritation/corrosion cutanées exposées dans la méthode d'essai B.4 (3) (4).

Description de la stratégie d'essai par étapes

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (graphique), il convient d'évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais oculaires *in vivo*. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations capitales (p. ex. un pH extrême), la totalité des informations existantes est prise en considération. Toutes les données pertinentes sur les effets du produit chimique en question, et de ses analogues structurels, seront examinées en vue d'une prise de décision fondée sur le poids de la preuve, décision qui fait l'objet de justification. Il convient d'accorder le plus de poids aux données humaines et animales existantes, puis aux résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* sur le produit chimique. Les études *in vivo* sur des substances corrosives devront être évitées autant que faire se peut. Les facteurs pris en compte dans la stratégie séquentielle sont repris ci-après:

Évaluation des données humaines et/ou animales existantes et/ou des résultats d'essais *in vitro* obtenus par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale (Étape 1).

⁽¹⁾ En ce qui concerne le recours à une stratégie d'essai intégrée pour l'irritation oculaire dans le cadre de REACH, voir également le guide des exigences d'information et d'évaluation de la sécurité chimique de l'ECHA, Chapitre R.7a: Informations spécifiques aux effets http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

En premier lieu, on examinera les données humaines existantes, notamment les études cliniques et en milieu professionnel ainsi que les rapports de cas, et/ou les résultats d'essais oculaires sur des animaux et/ou les données issues de méthodes d'essai *in vitro* du pouvoir irritant/corrosif sur l'œil validées et acceptées à l'échelle internationale, car ils fournissent des informations directement liées aux effets sur l'œil. On analysera ensuite les données disponibles provenant d'essais de corrosion/irritation cutanées sur les humains et/ou les animaux, et/ou de méthodes d'essai *in vitro* de l'effet corrosif sur la peau validées et acceptées à l'échelle internationale. Les produits chimiques dont le pouvoir corrosif ou fortement irritant pour les yeux est avéré ne sont pas instillés dans les yeux des animaux; pas plus que les produits chimiques corrosifs ou fortement irritants pour la peau, qui seront également considérés comme corrosifs et/ou irritants pour les yeux. Les produits chimiques dont le caractère non corrosif et non irritant a été suffisamment démontré par des études déjà réalisées sur l'œil ne font pas non plus l'objet d'essais oculaires *in vivo*.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (Étape 2).

S'ils sont disponibles, les résultats d'essais sur des produits chimiques structurellement proches sont pris en considération. S'il existe des données humaines et/ou animales suffisantes sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant, on peut supposer que le produit chimique étudié provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester le produit chimique. Les données négatives issues d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances n'offrent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'un produit chimique dans le cadre de la stratégie d'essai séquentielle. On déterminera son pouvoir corrosif ou irritant pour la peau et les yeux en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physicochimiques et réactivité chimique (Étape 3).

Les produits chimiques présentant des pH extrêmes, à savoir $\leq 2,0$ et $\geq 11,5$, sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice de poids quant au caractère corrosif ou irritant d'un produit chimique pour l'œil, sa réserve acide/alcali (pouvoir tampon) est également pris en compte (5) (6) (7). Si le pouvoir tampon suggère que le produit chimique pourrait ne pas être corrosif pour l'œil (produits chimiques présentant un pH extrême et une faible réserve acide/alcaline), d'autres essais seront mis en œuvre pour confirmer cette hypothèse, idéalement un essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté (voir paragraphe 10).

Prise en considération des autres informations existantes (Étape 4).

À ce stade, il y a lieu d'évaluer toutes les informations disponibles sur la toxicité systémique par voie cutanée. La toxicité cutanée aiguë du produit chimique d'essai est aussi à prendre en considération. Si l'on a constaté que le produit chimique d'essai est très toxique par voie cutanée, il n'est plus toujours nécessaire de le tester dans l'œil. Bien que la toxicité cutanée aiguë n'implique pas automatiquement un effet irritant ou corrosif sur l'œil, on peut supposer que si un produit chimique est fortement toxique par voie cutanée, son instillation dans l'œil déclenchera aussi un effet toxique. Ces données peuvent également être examinées entre la deuxième et la troisième étape.

Évaluation du pouvoir corrosif du produit chimique sur la peau, si les dispositions réglementaires l'exigent (Étape 5).

Les éventuels effets corrosifs et fortement irritants sur la peau seront d'abord évalués conformément à la méthode d'essai B.4 (4) et son supplément (8), qui prescrivent le recours à des méthodes d'essai *in vitro* de corrosion cutanée validées et acceptées à l'échelle internationale (9) (10) (11). Si le produit chimique s'avère corrosif ou fortement irritant pour la peau, on pourra également considérer qu'il aura le même effet sur l'œil. Par conséquent, il ne fera pas l'objet d'essais supplémentaires. Si le produit chimique n'est ni corrosif ni fortement irritant pour la peau, il convient de pratiquer un essai *in vitro* ou *ex vivo* sur les yeux.

Résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* (Étape 6).

Les produits chimiques qui se sont révélés corrosifs ou fortement irritants à l'issue d'essais *in vitro* ou *ex vivo* (12) (13) validés et acceptés à l'échelle internationale spécifiquement pour l'évaluation de la corrosion et de l'irritation oculaires n'ont pas besoin d'être testés sur les animaux. Il est très vraisemblable que ces produits chimiques produiront des effets aussi prononcés *in vivo*. S'il ne dispose pas d'un d'essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté, l'expérimentateur passera directement à la septième étape.

Essai *in vivo* sur le lapin (Étapes 7 et 8).

L'essai oculaire *in vivo* débute par un essai initial mené sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que le produit chimique exerce un effet corrosif ou fortement irritant sur les yeux, l'expérience s'arrête là. Si cet essai ne fait apparaître aucun effet corrosif ou fortement irritant, un essai de confirmation est pratiqué sur deux animaux supplémentaires. D'autres essais peuvent s'avérer nécessaires en fonction des résultats de l'essai de confirmation. [voir méthode d'essai B.5]

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION OCULAIRES

	Activité	Résultat	Conclusion
1	<p>Examiner les données humaines et/ou animales existantes, et/ou les données <i>in vitro</i> obtenues par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale montrant des effets sur les yeux</p> <p>Examiner les données humaines et/ou animales existantes et/ou les données <i>in vitro</i> obtenues par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale montrant des effets corrosifs pour la peau</p> <p>Examiner les données humaines et/ou animales existantes et/ou les données <i>in vitro</i> obtenues par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale montrant des effets fortement irritants pour la peau</p>	<p>Lésions oculaires sévères</p> <p>Effet irritant pour l'œil</p> <p>Effet ni corrosif ni irritant pour l'œil</p> <p>Effet corrosif pour la peau</p> <p>Effet fortement irritant pour la peau</p>	<p>Critère décisif; produit chimique considéré comme corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p> <p>Critère décisif; produit chimique considéré comme irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p> <p>Critère décisif; produit chimique considéré comme non corrosif et non irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p> <p>Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p> <p>Produit chimique supposé irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire</p>
	↓		
	<i>Pas d'information disponible ou informations non concluantes</i>		
	↓		
2	<p>Procéder à une analyse RSA pour la corrosion et l'irritation oculaires</p> <p>Envisager une analyse RSA pour la corrosion cutanée</p>	<p>Lésions oculaires sévères prévisibles</p> <p>Irritation oculaire prévisible</p> <p>Corrosion cutanée prévisible</p>	<p>Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p> <p>Produit chimique supposé irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p> <p>Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p>
	↓		
	<i>Effet impossible à prédire ou prédiction incertaine ou négative</i>		
	↓		
3	<p>Mesurer le pH (et le pouvoir tampon, le cas échéant)</p>	<p>pH ≤ 2 ou ≥ 11,5 (avec un pouvoir tampon élevé, le cas échéant)</p>	<p>Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.</p>
	↓		
	<i>2 < pH < 11,5, ou pH ≤ 2,0 ou ≥ 11,5 avec pouvoir tampon faible ou nul, le cas échéant</i>		
	↓		

	Activité	Résultat	Conclusion
4	Examiner les données existantes sur la toxicité systémique par voie cutanée	Toxicité aiguë aux concentrations utilisées dans l'essai oculaire.	Le produit chimique sera trop toxique pour être testé. Aucun essai nécessaire.
	↓		
	<i>Informations non disponibles, ou le produit chimique n'est pas très toxique</i>		
	↓		
5	Procéder à un essai de corrosion cutanée conforme à la démarche expérimentale indiquée dans le chapitre B.4 de la présente annexe si la réglementation l'exige également	Effet corrosif ou fortement irritant	Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
	↓		
	<i>Produit chimique ni corrosif ni fortement irritant pour la peau</i>		
	↓		
6	Procéder à un ou plusieurs essais oculaires <i>in vitro</i> ou <i>ex vivo</i> validés et acceptés	Effet corrosif ou fortement irritant Effet irritant Pas d'effet irritant	Produit chimique supposé corrosif ou fortement irritant pour l'œil, à condition que l'essai effectué détecte les produits chimiques corrosifs et fortement irritants et que le produit chimique d'essai entre dans son domaine d'applicabilité. Aucun essai supplémentaire nécessaire. Produit chimique supposé irritant pour l'œil, à condition que le ou les essais effectués détectent correctement les produits chimiques corrosifs, irritants et fortement irritants et que le produit chimique d'essai entre dans leur domaine d'applicabilité. Aucun essai supplémentaire nécessaire. Produit chimique supposé non irritant pour l'œil, à condition que le ou les essais effectués détectent correctement les produits chimiques non irritants, les distinguent efficacement des produits chimiques corrosifs, irritants et fortement irritants pour l'œil, et que le produit chimique d'essai entre dans leur domaine d'applicabilité. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
	↓		
	<i>Le ou les essais oculaires <i>in vitro</i> ou <i>ex vivo</i> validés et acceptés ne permettent pas de conclure</i>		
	↓		
7	Procéder sur un seul animal à un essai initial <i>in vivo</i> sur œil de lapin	Lésions oculaires sévères	Produit chimique considéré comme corrosif pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
	↓		
	<i>Pas de lésions sévères, ou aucun effet</i>		
	↓		

	Activité	Résultat	Conclusion
8	Procéder à un essai de confirmation sur un ou deux animaux supplémentaires	Effet corrosif ou irritant	Produit chimique considéré comme corrosif ou irritant pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
		Effet ni corrosif ni irritant	Produit chimique considéré comme non irritant et non corrosif pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1996), OECD Test Guidelines Programme: *Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods*, Atelier organisé à Solna (Suède) les 22 — 24 janvier 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OCDE (1998), *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, adopté par la 28^e Réunion conjointe du Comité des produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques, novembre 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. et Fentem J.H. (1999), A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies., *ATLA* 27, 161-177.
- (4) Chapitre B.4 de la présente annexe, Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.
- (5) Young, J.R. et autres (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227 — 231.
- (8) Supplément au chapitre B.4 de la présente annexe, Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées.
- (9) Chapitre B.40 de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET)*.
- (10) Chapitre B.40bis de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine*.
- (11) OCDE (2006), *Essai n° 435: Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OCDE Paris.
- (12) Chapitre B.47 de la présente annexe, Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave
- (13) Chapitre B.48 de la présente annexe, Méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.»

▼B**B.6. SENSIBILISATION CUTANÉE****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION***Remarques*

La sensibilité des essais et leur capacité à détecter les substances susceptibles d'entraîner une sensibilisation cutanée chez l'homme sont des critères importants dans un système de classification de la toxicité établi à des fins de santé publique.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier de manière adéquate toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation cutanée pour l'homme et qui puisse être appliquée à toutes les substances.

Divers facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, y compris son pouvoir de pénétration cutanée, doivent être pris en considération lors du choix de l'essai.

Deux types d'essai utilisant des cobayes ont été développés: d'une part, les essais avec adjuvant dans lesquels l'état est potentialisé par la dissolution ou la mise en suspension dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF) de la substance à tester, et d'autre part les essais sans adjuvant.

Les essais avec adjuvant ont généralement un meilleur pouvoir prédictif du potentiel sensibilisant cutanée de la substance testée avec plus de précision que les méthodes qui n'utilisent pas l'adjuvant complet de Freund. C'est la raison pour laquelle leur utilisation est préférable.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GPMT: Guinea Pig Maximisation Test) est un essai avec adjuvant très répandu. Bien qu'il existe plusieurs autres méthodes pour détecter le potentiel de sensibilisation cutanée, le GPMT est l'essai avec adjuvant de prédilection.

Les essais sans adjuvant (l'essai de Buehler étant préférable) sont considérés comme moins sensibles vis-à-vis de nombreuses classes de produits chimiques.

Dans certains cas, l'essai de Buehler qui consiste en une application topique, peut s'avérer préférable à l'essai de maximalisation qui nécessite une injection intradermique. L'utilisation de l'essai de Buehler doit être scientifiquement justifiée.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT) et l'essai de Buehler sont décrits dans cette méthode. D'autres méthodes peuvent être utilisées, à condition qu'elles soient correctement validées et que leur utilisation soit scientifiquement justifiée.

Si un résultat positif est obtenu dans un test de dépistage reconnu, une substance peut être considérée comme un sensibilisant potentiel et il peut ne pas être nécessaire de réaliser un essai complémentaire sur le cobaye. Cependant si un résultat négatif est obtenu dans un tel test de dépistage, un essai sur le cobaye doit être effectué en utilisant la procédure décrite dans la présente méthode d'essai.

Voir également introduction générale, partie B.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée à une substance. Chez l'homme, la réaction peut se caractériser par un prurit, un érythème, un œdème, des vésicules, des bulles ou une association de ces manifestations. Dans les autres espèces, la réaction peut différer et prendre uniquement la forme d'un érythème ou d'un œdème.

Exposition d'induction: exposition expérimentale d'un sujet à une substance dans le but d'induire une hypersensibilité.

Période d'induction: période d'au moins une semaine consécutive à l'exposition d'induction, au cours de laquelle une hypersensibilité peut s'installer.

Exposition de déclenchement: exposition expérimentale, après période d'induction, d'un sujet préalablement exposé à la substance, dans le but de vérifier si le sujet présente une réaction d'hypersensibilité.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée doivent être vérifiées tous les six mois à l'aide de substances ayant des propriétés connues de sensibilisation cutanée faible à modérée.

Pour un essai conduit selon les règles, les substances faiblement ou moyennement sensibilisantes provoquent normalement une réaction d'au moins 30 % dans les méthodes avec adjuvant et 15 % dans les méthodes sans adjuvant.

Les substances suivantes seront de préférence utilisées:

Numéro CAS	Numéro EINECS	Dénomination EINECS	Dénomination usuelle
101-86-0	202-983-3	α -hexylcinnamaldéhyde	α -hexylcinnamaldéhyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazole-2-thiol (mercaptobenzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	nordcaïne

Dans certaines circonstances dûment justifiées, il est possible d'utiliser d'autres substances répondant aux critères ci-dessus.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux d'expérience sont dans un premier temps exposés à la substance à tester par une injection intradermique et/ou une application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire peut se produire, les animaux sont exposés à une dose de déclenchement. L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux sont alors comparées à celles de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu un placebo lors de l'induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

1.5. DESCRIPTION DES MÉTHODES D'ESSAI

Si l'élimination de la substance à tester s'avère nécessaire, ceci doit être fait en utilisant de l'eau ou un solvant approprié afin de ne pas modifier la réaction existante ou l'intégrité de l'épiderme.

▼B1.5.1. *Essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT)*

1.5.1.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont tondus, rasés ou épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.1.2. Conditions de l'essai

1.5.1.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.1.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 10 animaux et le lot témoin, au moins 5. Si le lot traité comprend moins de 20 animaux et le lot témoin moins de 10, et qu'il n'est pas possible de conclure que la substance à tester est un agent sensibilisant. Dans ce cas, il est fortement recommandé d'utiliser d'autres animaux afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux d'essai et 10 animaux témoins.

1.5.1.2.3. Doses

La concentration de substance utilisée pour chaque exposition d'induction doit être bien tolérée par l'organisme des animaux et doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux. À cet effet, il convient d'utiliser des animaux traités par l'adjuvant complet de Freund.

1.5.1.3. Mode opératoire

1.5.1.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont pratiquées dans la région scapulaire préalablement débarrassée de ses poils, de part et d'autre de la ligne médiane.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: la substance à tester dans un véhicule adéquat, à la concentration sélectionnée

Injection 3: la substance à tester à la concentration voulue, mélangée dans un rapport 1:1 (v/v) à de l'adjuvant complet de Freund ou du sérum physiologique.

Pour l'injection 3, les substances hydrosolubles sont dissoutes dans la phase aqueuse avant d'être mélangées avec l'adjuvant complet de Freund. Les substances liposolubles ou insolubles sont d'abord mises en suspension dans l'adjuvant complet de Freund, puis mises en phase aqueuse. La concentration finale de la substance à tester doit être égale à celle utilisée pour l'injection 2.

▼B

Les injections 1 et 2 sont pratiquées à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 est effectuée vers la partie caudale de la zone d'essai.

Jour 0 — lot témoin

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont réalisées aux mêmes endroits que chez les animaux traités.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: le véhicule non dilué

Injection 3: formulation à 50 % du véhicule dans un mélange 1:1 d'adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique.

5^e — 7^e jour — lot traité et lot témoin

Environ 24 heures avant l'application topique d'induction et si la substance ne provoque pas d'irritation cutanée, la zone d'essai rasée et/ou tondu est badigeonnée avec 0,5 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans de la vaseline, afin de créer une irritation locale.

6^e — 8^e jour — lot traité

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Un papier filtre (2 x 4 cm) imprégné de la substance dans le véhicule approprié est appliqué sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau à l'aide d'un pansement occlusif pendant 48 heures. Le choix du véhicule doit être justifié. Les substances solides sont réduites en poudre fine et incorporées dans un véhicule approprié; les substances liquides peuvent éventuellement être appliquées directement.

6^e — 8^e jour — lot témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué comme indiqué précédemment sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.2. Déclenchement

20^e — 22^{ème} jour — lot traité et lot témoin

Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Un patch ou une cupule chargés de la substance à tester est appliquée sur un des flancs des animaux et, s'il y a lieu, un patch ou une cupule imprégnés uniquement du véhicule est appliquée sur l'autre flanc. Les pastilles sont maintenues en contact avec la peau pendant 24 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.3. Observation et cotation: lot traité et lot témoin

- Environ 21 heures après le retrait de la pastille, la zone étudiée est nettoyée et rasée et/ou tondu et épilée si nécessaire;
- 3 heures plus tard environ (à peu près 48 heures après le début de l'application de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;
- environ 24 heures après cette observation, on procède à une seconde observation (72 heures) et à une nouvelle cotation.

Il est recommandé de procéder à une lecture en aveugle chez les animaux traités et les animaux témoins.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement (c'est-à-dire redéclenchement), si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

▼B

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement, doivent être observées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

1.5.2. *Essai de Buehler*

1.5.2.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont coupés, rasés ou éventuellement épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.2.2. Conditions de l'essai

1.5.2.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.2.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 20 animaux et le lot témoin, au moins 10.

1.5.2.2.3. Doses

Pour chaque exposition d'induction, la concentration de substance à utiliser est la concentration maximale entraînant une irritation modérée mais non excessive. Pour l'exposition de déclenchement, la concentration à utiliser est la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux.

Pour les substances hydrosolubles, il convient d'utiliser comme véhicule de l'eau ou une solution diluée non irritante de surfactant. Pour les autres substances, il est préférable d'utiliser un mélange d'éthanol à 80 % dans de l'eau pour l'induction, et de l'acétone pour le déclenchement.

1.5.2.3. Mode opératoire

1.5.2.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Un des flancs des animaux est rasé. La compresse servant à réaliser le test est imprégnée de la substance à tester incorporée dans un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; les substances liquides peuvent au besoin être appliquées directement). La compresse est appliquée sur la zone d'essai et maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié.

▼B

Le système doit être occlusif. Un tampon de ouate rond ou carré de 4 à 6 cm² convient. Il est préférable d'utiliser un dispositif de contention approprié pour garantir l'occlusion. Si l'on utilise des bandages, des expositions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires.

Jour 0 — lot témoin

Un des flancs des animaux est rasé. Le véhicule seul est appliqué de la façon décrite pour les animaux traités. La compresse servant à réaliser le test est maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié. S'il peut être prouvé qu'il n'est pas nécessaire de simuler le traitement sur le lot témoin, cette étape peut être omise, un contrôle ne recevant rien peut être utilisé.

6^e — 8^e jour et 13^e — 15^e jour — lot traité et lot témoin

La même application que celle décrite au jour 0 est réalisée sur la même zone (débarassée de ses poils si nécessaire) du même flanc au 6^e — 8^e jour, puis à nouveau au 13^e — 15^e jour.

1.5.2.3.2. Déclenchement

27^e — 29^e jour — lot traité et lot témoin

Le flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin est rasé. Une compresse occlusive ou une cupule contenant la quantité appropriée de la substance à tester, à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation, est appliquée sur la partie postérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin.

S'il y a lieu, on appliquera également une compresse occlusive ou une cupule ne contenant que le véhicule sur la partie antérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin. Les compresses ou cupules sont maintenues en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 6 heures.

1.5.2.3.3. Observations et cotation

- Environ 21 heures après le retrait de la compresse, la zone d'essai est débarrassée de ses poils;
- environ trois heures plus tard (à peu près 30 heures après le début de l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;
- environ 24 heures après cette observation (soit environ 54 heures après l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est à nouveau observée et cotée.

Il est recommandé d'effectuer une lecture en aveugle de la réaction dans le lot traité et le lot témoin.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement, si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

▼B

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement (c'est-à-dire de redéclenchement), doivent être consignées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

2. **RÉSULTATS (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Les résultats sont récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal, la réaction cutanée lors de chaque observation.

3. **COMPTE RENDU (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Lorsqu'un test de dépistage [par exemple essai local sur ganglions lymphatiques (LLNA), essai de gonflement de l'oreille de souris (MEST)], est effectué préalablement à l'essai sur le cobaye, il convient d'en fournir la description ou la référence, ainsi que les détails du mode opératoire et les résultats obtenus avec la substance à tester et les substances de référence.

Procès-verbal d'essai (GMPT et essai de Buehler)

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- souche de cobayes utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- technique de préparation du site d'application,
- détails sur les matériaux utilisés pour l'application et la technique d'application,
- résultats de l'étude pilote et conclusions concernant les concentrations d'induction et de déclenchement à utiliser dans l'essai,
- détails concernant la préparation, l'application et l'élimination de la substance à tester,
- justification du choix du véhicule,
- concentrations du véhicule et de la substance à tester utilisées pour les expositions d'induction et de déclenchement, et quantité totale de substance appliquée pour l'induction et le déclenchement.

Résultats:

- résumé des résultats du dernier contrôle de sensibilité et de fiabilité (voir 1.3), y compris informations sur la substance, la concentration et le véhicule utilisés,

▼B

- toute observation effectuée sur chaque animal, cotations comprises,
- description de la nature et de la gravité des effets observés,
- toute observation histopathologique.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 406 de l'OCDE.

▼B

Appendice

TABLEAU

échelle de Magnusson et Kligman pour la cotation des réactions cutanées à une exposition de déclenchement

0 = pas de modification apparente

1 = érythème discret ou localisé

2 = érythème modéré et confluent

3 = érythème intense avec gonflement

▼M4**B.7. ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 407 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 407 originale avait 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 méthode B.7 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 méthode d'essai 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 de la présente méthode d'essai B.7 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 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.

▼ M4

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 méthode d'essai B.7 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 méthode d'essai. 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 appendice 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 méthode d'essai 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 substances affectant faiblement ou fortement la fonction thyroïdienne, ainsi que des substances 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 substances ne doit donc pas s'appuyer uniquement sur les résultats de la présente méthode d'essai, 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 substances) doit adopter une méthode large ne s'appuyant pas sur les résultats de cette seule méthode d'essai.
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'appendice 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 voie

▼ M4

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 méthode d'essai 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 méthode d'essai B.7 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 °C ($\pm 3\text{ °C}$). 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.

▼M4

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. À 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 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, 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 1 000 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.

▼ M4**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, automutilation, 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.

▼ **M4**

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. À 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. À la fin de la période d'essai, il faut procéder aux examens hématologiques suivants: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, reticulocytes, 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 ⁽¹⁾.

Biochimie clinique

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. À 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.

⁽¹⁾ 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.

▼ **M4**

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 hypophysio-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 standards.

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.

▼ **M4**

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 de l'OCDE (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 (préservés par injection de fixateur, puis immergés), les gonades (testicules et ovaires), les organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épидидymes, 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 poplité 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 d'essai.
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, épидидymes, 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 appendice 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 œstral 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

▼ **M4****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 rat.

Conditions d'essai:

- justification du choix des doses,
- description détaillée de la préparation de la substance à tester et/ou de son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

▼ M4

- 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*

▼ **M4***Appendice 1*

DÉFINITIONS

Activité antiandrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) 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 antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Activité thyroïdienne: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

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

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.

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

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.

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

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

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.

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.

▼ **M4***Appendice 2***Paramètres recommandés dans la méthode d'essai B.7 pour la détection des perturbateurs endocriniens**

Paramètres obligatoires	Paramètres facultatifs
Poids	
<ul style="list-style-type: none"> — Testicules — Épидidymes — Glandes surrénales — Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes 	<ul style="list-style-type: none"> — Ovaires — Utérus, y compris col de l'utérus — Thyroïde
Histopathologie	
<ul style="list-style-type: none"> — Gonades: <ul style="list-style-type: none"> — Testicules et — Ovaires — Organes sexuels auxiliaires: <ul style="list-style-type: none"> — Épидidymes, — Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes — Utérus, y compris col de l'utérus — Glandes surrénales — Thyroïde — Vagin 	<ul style="list-style-type: none"> — Frottis vaginaux — Glandes mammaires mâles — Hypophyse
Dosages hormonaux	
	<ul style="list-style-type: none"> — Niveaux circulants de T3 et de T4 — Niveaux circulants de TSH

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (Paris, 1992). Rapport du président de la réunion du groupe de travail ad hoc d'experts sur la 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.

▼ **M4**

- (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 (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr2649_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. 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) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D. et Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol* 33: 404-407.
- (16) Hess R.A., Moore B.J. (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, p. 52-85.
- (17) Latendresse J.R., Warbritton A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (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. (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4**B.8. TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS****RÉSUMÉ**

La présente méthode d'essai B.8 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation de la substance d'essai, à la suite d'une exposition répétée sur une période de temps limitée (28 jours), et de fournir des données pour les estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs, composés d'au minimum 5 mâles et 5 femelles, sont exposés 6 heures par jour, pendant 28 jours: a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode d'essai laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (réversibilité), des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 412 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le texte original de la ligne directrice 412 sur la toxicité subaiguë par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.8 (équivalente à la ligne directrice 412) a été révisée pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences réglementaires actuelles et futures.
2. La présente méthode permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 28 jours. Les données issues d'une étude sur la toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours peuvent être utilisées pour des estimations quantitatives de risques (si l'étude n'est pas suivie d'un essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours, voir chapitre B.29 de la présente annexe). Ces données peuvent également fournir des informations permettant la détermination des concentrations pour des études à plus long terme comme l'essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité *in vitro* ou *in vivo* auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues des essais de toxicité aiguë par inhalation. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.

▼ M4

4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré, voir document d'orientation 39 (2). Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.
5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Sélection des espèces animales**

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

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

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne provoquent pas chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour les empêcher de filtrer l'aérosol d'essai grâce à la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

▼ **M4****Chambres d'inhalation**

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie pour les études de toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au «pire des cas», 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatiles (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations peut s'avérer nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée au choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.
12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Pour chaque niveau de concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 14 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

▼ **M4**

13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérisation érythro, les hormones thyroïdiennes (T3, T4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subaiguë comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 17). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs (5 mâles et 5 femelles) exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines (soit une durée totale de l'étude de 28 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées « nez seul », il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition « corps entier » de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition « corps entier », les animaux peuvent boire de l'eau.
15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:
- le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,
 - le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) doi(ven)t être espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,
 - le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Étude satellite (étude de réversibilité)

16. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de cinq mâles et de cinq femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin concurrent (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 17).

▼ M4**Animaux témoins**

17. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et ce véhicule témoin est utilisé.

CONDITIONS D'EXPOSITION**Administration des concentrations**

18. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou d'un mélange des deux. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

19. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser (4) des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm , avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0. Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

20. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION**Débit d'air dans la chambre d'exposition**

21. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par

▼ M4

exposition et par jour. Un soin particulier est apporté à éviter toute rerespiration dans les chambres d'exposition «nez seul». La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasser pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

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

Substance d'essai: concentration nominale

23. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

24. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.
25. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il conviendrait de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

▼ M4

26. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptée. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).
27. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou de vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion et substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la principale substance active du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

28. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.
29. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.
30. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

31. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition «corps entier» ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.

▼ M4

32. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.
33. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

34. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 2 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION D'EAU ET DE NOURRITURE

35. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

PATHOLOGIE CLINIQUE

36. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).
37. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

▼ **M4**

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle
Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransférase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlore
Globuline	
Analyse d'urines (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	

(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant sa nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).

38. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative des paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

▼ **M4****MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES**

39. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
40. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épидидymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

Tableau 2

Organes et Tissus à Conserver Pendant L'autopsie Macroscopique

[Bulbe olfactif]	Reins
Capsules surrénales	Testicules
Cerveau (y compris les tronçons du cortex cérébral et de la moelle/du pont)	Testicules
Cœur	Thymus
Estomac	Thyroïde
Foie	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit du nasopharynx et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
Ganglions lymphatiques depuis la région hilare du poumon, spécialement pour les substances d'essai particulières peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Larynx (3 niveaux, dont 1 niveau qui comprend la base de l'épiglotte)	Utérus
Moelle épinière (niveau cervical, au milieu du thorax et lombaire)	Vésicules séminales
Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)	[Vessie]
Œsophage	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
Ovaires	Toutes lésions macroscopiques
Poumons (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)	
Rate	

▼ M4

41. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau, comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).
42. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit du nasopharynx (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

43. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes surviennent dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Résultats**

44. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et fortuits, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

45. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.

▼ M4

- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles proviennent d'animaux exposés à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.
- Nombre, âge et sexe des animaux.
- Méthode de randomisation.
- Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).
- Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

- Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.
- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.
- Source d'air et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.
- Différence de pression (positive ou négative).
- Orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»).
- Stabilité de l'atmosphère d'essai.
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.
- Traitement de l'air fourni/évacué.
- Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»).
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).
- Nombre de changements de volume par heure.
- Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

- Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.

▼ M4

- Concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).
- Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges d'essai produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.
- Toutes les concentrations d'air sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).
- Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

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

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g .
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (pour les animaux montrant des signes de toxicité, notamment mortalité, nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).

▼ M4

- Tableau du poids de chacun des animaux.
- Tableau de la consommation de nourriture.
- Tableau des résultats de pathologie clinique.
- Résultats de l'autopsie et observations histopathologiques pour chaque animal, s'ils sont disponibles.
- Tableau de tous les autres paramètres mesurés.

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.
- La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).
- Le ou les organes cibles sont identifiés.
- La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1981). Toxicité à doses répétées par inhalation, Ligne directrice n° 412 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (4) Whalan J.E. et Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼ M4

- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼ M4

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B**B.9. TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est appliquée quotidiennement, à doses croissantes, sur la peau de plusieurs lots d'animaux d'expérience pendant une période déterminée, à raison d'une seule dose par lot, pendant une durée de 28 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience ainsi que ceux qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience sont autopsiés.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**1.6.1. Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots témoins et traités. Peu de temps avant l'essai, on tond la région dorsale du tronc des animaux. On peut avoir recours au rasage mais, dans ce cas, l'opération doit être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est en général nécessaire de répéter les opérations de tonte ou de rasage à des intervalles d'une semaine environ, en évitant toute lésion de la peau. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal doit être pris en considération pour décider de la taille de la zone à épiler, et de la dimension de la surface à traiter. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. Conditions de l'essai**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

On peut utiliser des rats, des lapins ou des cobayes adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation.

▼B

Au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. *Nombre et sexe*

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles), à la peau saine, sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non-gravides. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. De plus, un lot satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. *Doses*

On utilise au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin traité avec le véhicule. La période d'exposition devra être d'au moins 6 heures par jour. La substance à tester doit être appliquée chaque jour au même moment et les quantités à administrer doivent faire l'objet d'une adaptation régulière (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux. Excepté l'administration de substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les animaux des lots d'expérience. Lorsqu'un véhicule est utilisé pour faciliter l'administration, celui-ci sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions qu'aux lots traités et la quantité de véhicule correspondra à celle reçue par le groupe traité avec la dose de substance d'essai la plus élevée. La dose la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation concernant l'exposition de l'homme, la dose la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la concentration intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs concentrations intermédiaires, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots recevant les doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minimale pour que l'évaluation des résultats soit valable.

Si l'application de la substance d'essai provoque une irritation cutanée grave, les concentrations doivent être réduites, ce qui peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. De plus, si les lésions cutanées sont très graves, il peut se révéler nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.2.4. *Essai «limite»*

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg de poids corporel ou avec une dose plus élevée en fonction de l'exposition possible pour l'homme, n'a provoqué aucun effet toxique, il peut s'avérer inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. *Période d'observation*

Les animaux d'expérience doivent faire l'objet d'une observation quotidienne afin de déceler les symptômes d'intoxication. Le moment où les symptômes d'intoxication apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort doivent être consignés.

▼B**1.6.3. Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7, pendant une période de 28 jours. Les animaux de tous les lots satellites destinés à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de constater la régression ou la persistance des effets toxiques. La durée de l'exposition doit être au moins de 6 heures par jour.

La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface représentant environ 10 % de la surface corporelle totale mais lorsqu'il s'agit de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être réduite. La couche de substance doit être aussi mince et uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'une compresse de gaze poreuse et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée doit, en outre, être convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et de manière à éviter que les animaux puissent ingérer la substance à tester. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée. Il est également possible d'utiliser la technique du «collier de protection».

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer la substance résiduelle avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être notés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somatomotrice et du comportement. Les animaux doivent être pesés chaque semaine. Il est également recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire des animaux. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que, dans la mesure du possible, ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus au cours des remises en cages. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux moribonds et les animaux dans un état de détresse ou de douleur intenses doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;
2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales: alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique), aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutano-oxaloacétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

D'autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique.

▼B

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.4. **Autopsie**

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie macroscopique. Au moins le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Organes et tissus, à savoir, peau normale et traitée, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, cœur et les organes-cibles (c'est-à-dire ceux qui présentent des lésions importantes ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs.

1.6.5. **Examen histopathologique**

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le lot témoin, il faut pratiquer un examen histologique systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions attribuables à la substance à tester à la dose la plus élevée devront être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux de tout lot satellite devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les lots traités.

2. **DONNÉES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RÉSULTATS**

3.1. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

- données concernant les animaux (espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.),
- conditions de l'essai, (y compris le type de pansement: occlusif ou non-occlusif),
- doses (avec, le cas échéant, le véhicule) et concentrations,
- dose sans effet, lorsque c'est possible,
- données relatives à la réponse toxique par sexe et par dose,
- indication du moment de la mort en cours d'expérience ou des survies au terme de l'expérience,
- effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,
- données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel,
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets,

▼B

- examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION**

Voir introduction générale, partie B (point D).

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B (point E).

«B.10 Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 473 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succinctes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* est destiné à détecter les produits chimiques qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de mammifère cultivées (2) (3) (4). Les aberrations structurales peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiques. Il est possible que des cas de polyploïdie (y compris d'endoreduplication) surviennent dans les essais d'aberration chromosomique *in vitro*. Si les aneugènes peuvent induire une polyploïdie, la polyploïdie seule n'est pas le signe d'un potentiel aneugène et peut simplement indiquer une perturbation du cycle cellulaire ou une cytotoxicité (5). Cet essai n'est pas conçu pour mesurer l'aneuploïdie. Pour détecter l'aneuploïdie, il est recommandé de réaliser un test du micronoyau *in vitro* (6).

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou des cultures de cellules primaires d'origine humaine ou de rongeurs. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée des aberrations chromosomiques (7). Les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'émettre des recommandations fermes mais tendent à montrer qu'il importe de tenir compte, lors de l'évaluation des dangers chimiques, du statut du p53, de la stabilité génétique (caryotype), de la capacité de réparation de l'ADN et de l'origine (rongeurs ou humains) des cellules retenues pour l'essai. Les utilisateurs de la présente méthode d'essai sont donc invités à prendre en considération l'influence de ces caractéristiques cellulaires, et d'autres caractéristiques, sur les performances d'une lignée cellulaire quant à la détection de l'induction d'aberrations chromosomiques, sachant que les connaissances évoluent dans ce domaine.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les produits chimiques testés, les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs, c'est-à-dire à une lésion chromosomique qui ne soit pas causée par une interaction directe entre le produit chimique d'essai et les chromosomes; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité (8) (9) (10), une interaction avec les composants du milieu (11) (12) ou une cytotoxicité excessive (13) (14) (15) (16).

Cet essai permet de détecter les aberrations chromosomiques pouvant résulter d'évènements clastogènes. L'analyse de l'induction d'une aberration chromosomique doit être effectuée sur des cellules en métaphase. Il est donc indispensable que les cellules des cultures traitées et des cultures témoins atteignent le stade de la mitose. Pour les nanomatériaux manufacturés, il peut s'avérer nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette méthode d'essai, mais ces adaptations ne sont pas décrites dans le présent document.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Des cultures cellulaires d'origine humaine ou provenant d'autres mammifères sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines (voir paragraphe 13). Après avoir été exposées au produit chimique d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par un produit chimique bloquant la métaphase (par exemple la colchicine ou le colcemide), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique permettant de déceler les aberrations chromatidiques et chromosomiques.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

Diverses lignées cellulaires (par exemple, ovaire de hamster chinois (CHO), poumon de hamster chinois V79, poumon de hamster chinois (CHL)/IU, TK6) ou cultures de cellules primaires peuvent être utilisées, y compris des lymphocytes du sang périphérique humain ou d'autres mammifères (7). Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement. En cas d'utilisation de cellules primaires, pour des raisons relatives au bien-être des animaux, il conviendra d'envisager, lorsque cela est possible, le recours à des cellules primaires d'origine humaine, prélevées dans le respect des principes éthiques et de la réglementation en la matière. Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), non fumeurs, ne souffrant d'aucune maladie connue et n'ayant pas été exposés récemment à des niveaux d'agents génotoxiques (produits chimiques, rayonnements ionisants, par exemple) susceptibles d'augmenter l'incidence de fond des aberrations chromosomiques, ceci afin de garantir que cette incidence soit faible et homogène. L'incidence de fond des aberrations chromosomiques augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (17) (18). Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. Il est nécessaire de démontrer que les cellules se sont divisées entre le moment où elles ont été traitées avec le produit chimique d'essai et leur prélèvement. Les cultures cellulaires sont maintenues dans une phase de croissance exponentielle (lignées cellulaires) ou encouragées à se diviser (cultures primaires de lymphocytes) en vue de l'exposition des cellules à différents stades du cycle cellulaire, étant donné que la sensibilité des stades cellulaires aux produits chimiques d'essai peut ne pas être connue. En général, les cellules primaires dont la division doit être stimulée par des agents mitogènes ne sont plus synchronisées lors de leur exposition au produit chimique d'essai (les lymphocytes humains après une stimulation mitogène de 48 heures, par exemple). L'utilisation de cellules synchronisées pendant le traitement n'est pas recommandée mais peut être acceptable si elle est justifiée.

Milieu et conditions de culture

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ si nécessaire, température d'incubation de 37°C) appropriées pour les cultures. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires (7) (19), et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire des lignées ou des cultures primaires utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées (20).

Préparation des cultures

Lignées cellulaires: les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle jusqu'au moment de la récolte (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

Lymphocytes: un sang total traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture (pendant 48 heures pour les lymphocytes humains, par exemple) en présence d'un mitogène [phytohémagglutinine (PHA) pour les lymphocytes humains, par exemple] afin d'induire une division cellulaire avant l'exposition au produit chimique d'essai.

Activation métabolique

Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (21) (22) (23) ou un mélange de phénobarbital et β -naphthoflavone (24) (25) (26) (27) (28) (29). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (30) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (24) (25) (26) (28). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % (v/v) mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Pendant le traitement, on évitera d'utiliser des produits entraînant une réduction de l'indice mitotique, en particulier des complexants du calcium (31). Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 23). Les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (32) (33) (34). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

Conditions de l'essai

Solvants

Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que c'est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel (éthanol ou acétone par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir appendice 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou clastogène.

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'essai

Lors de la détermination de la plus forte concentration de produit chimique d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 22), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 23), ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 5). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules traitées a atteint la mitose pendant l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphes 18 et 22). La cytotoxicité doit être mesurée lors de l'expérience principale avec et sans système d'activation métabolique, au moyen d'un indicateur pertinent de mort et de croissance cellulaires. Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. S'il est réalisé, il ne doit pas remplacer la mesure de cytotoxicité effectuée dans le cadre de l'expérience principale.

La mesure du doublement relatif de la population (*Relative Population Doubling*, RPD) et celle de l'augmentation relative du nombre de cellules (*Relative increase in cell count*, RICC) sont des méthodes adaptées pour évaluer la cytotoxicité dans les essais de cytogénétique (13) (15) (35) (36) (55) (voir formules à l'appendice 2). En cas de traitement de longue durée et lorsque les prélèvements sont effectués au-delà de 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (soit plus de 3 cycles cellulaires au total), il se peut que le RPD sous-estime la cytotoxicité (37). Dans ces circonstances, la RICC pourrait constituer une meilleure mesure, mais l'évaluation de la cytotoxicité à l'aide du RPD après une durée équivalente à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire fournit néanmoins une estimation précieuse.

Si l'indice mitotique (MI) mesure les effets cytotoxiques/cytostatiques sur les lymphocytes dans les cultures primaires, il est aussi influencé par le temps écoulé entre le début de l'exposition et le moment de la mesure, par le mitogène employé et par une éventuelle interruption du cycle. Toutefois, le MI constitue une mesure acceptable, car d'autres mesures de toxicité peuvent s'avérer laborieuses et peu pratiques, et ne pas forcément s'appliquer à la population cible de lymphocytes se développant en réponse à une stimulation par PHA.

Les paramètres de cytotoxicité recommandés sont la RICC et le RPD pour les lignées cellulaires, et le MI pour la culture primaire des lymphocytes; néanmoins, d'autres indicateurs (tels que l'intégrité cellulaire, l'apoptose, la nécrose et le cycle cellulaire) peuvent fournir d'autres informations utiles.

Il convient d'évaluer au moins trois concentrations d'essai (sans compter les témoins de solvant et les témoins positifs) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Quel que soit le type de cellules (lignées cellulaires ou cultures primaires de lymphocytes), chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandé, l'utilisation de cultures en exemplaire unique est aussi acceptée à condition que le nombre total de cellules analysées par concentration reste identique qu'il s'agisse de cultures uniques ou de répliques. L'utilisation de cultures uniques est pertinent en particulier lorsqu'on évalue plus de 3 concentrations (voir paragraphe 31). Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée peuvent être regroupés pour l'analyse des données (38). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 22 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte pente et, pour obtenir des données dans le cadre d'une cytotoxicité faible et modérée ou étudier la relation dose-réponse en détail, il faudra donc utiliser des concentrations plus rapprochées et/ou plus de trois concentrations (cultures uniques ou répliques), notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 47).

Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité de 55 ± 5 % selon les paramètres de cytotoxicité recommandés (à savoir une réduction de la RICC et du RPD pour les lignées cellulaires et une réduction du MI pour les cultures primaires de lymphocytes à 45 ± 5 % du témoin négatif concomitant). Les résultats positifs présents uniquement dans la tranche la plus haute de la plage de cytotoxicité 55 ± 5 % doivent être interprétés avec prudence (13).

Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. À la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai (coloration ou analyse, par exemple). Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40) (41). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas d'une substance de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (UVCB) (42), de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (43).

Témoins

Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 15), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque moment de récolte.

Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire à identifier les clastogènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres produits chimiques peuvent être utilisés comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un clastogène nécessitant une activation métabolique. À condition qu'elle soit réalisée simultanément à l'essai non activé et sur la même durée de traitement, cette réponse de témoin positif unique démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Un traitement de longue durée (sans S9) doit toutefois disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai (c'est-à-dire que les effets sont nets mais que l'identité des lames codées n'est pas évidente pour l'examineur) et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai.

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS
1. Clastogènes actifs sans activation métabolique		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	Oxyde de nitro-4-quinoléine	56-57-5
	Cytosine-arabinoside	147-94-4
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique d'essai

Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique.

Délai de récolte des cultures

Pour une évaluation complète, laquelle serait nécessaire pour conclure à un résultat négatif, les trois conditions expérimentales suivantes doivent être respectées pour un traitement de courte durée avec et sans activation métabolique, et pour un traitement de longue durée sans activation métabolique (voir paragraphes 43, 44 et 45):

- Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai sans activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (18).
- Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai avec activation métabolique pendant 3 à 6 heures, puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (18).
- Les cellules sont exposées en continu sans activation métabolique jusqu'au moment du prélèvement à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 fois le cycle cellulaire normal. Certains produits chimiques (analogues de nucléosides, par exemple) peuvent être détectés plus facilement en prolongeant le temps de traitement et de prélèvement au-delà de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire (24).

Si l'une de ces conditions expérimentales entraîne une réponse positive, il n'est pas forcément nécessaire d'étudier les autres régimes de traitement.

Préparation des chromosomes

Les cultures de cellules sont traitées au colcemide ou à la colchicine pendant une période de une à trois heures avant la récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément en vue de la préparation des chromosomes. La préparation des chromosomes passe par un traitement hypotonique des cellules, leur fixation et leur coloration. Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant le produit chimique d'essai. Si l'on constate une augmentation substantielle du nombre de cellules mitotiques par rapport aux témoins, ce qui indiquerait l'arrêt probable de la mitose, les cellules doivent être récoltées par centrifugation puis réintroduites dans les cultures afin d'éviter de perdre les cellules en phase de mitose, et présentant un risque d'aberration chromosomique, au moment de la récolte.

Analyse

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope pour déceler les aberrations chromosomiques. Le procédé de fixation provoquant souvent la perte de chromosomes pour une certaine fraction des cellules en métaphase, les cellules examinées doivent donc contenir un nombre de centromères égal au nombre modal ± 2 .

Il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase bien étalées par concentration et par témoin pour conclure qu'un produit chimique d'essai est clairement négatif (voir paragraphe 45). Les 300 cellules doivent être réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 21), il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase bien étalées par culture. L'examen de 300 cellules présente l'avantage d'augmenter la puissance statistique de l'essai. En outre, il est rare d'observer des valeurs nulles (de l'ordre de 5 % seulement) (44). Le nombre de métaphases examinées peut être réduit lorsqu'un grand nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques est observé et s'il a été conclu que le produit chimique d'essai est clairement positif.

Les cellules présentant une/des aberration(s) chromosomique(s) structurale(s), lacunes comprises et non comprises, doivent être examinées. Les cassures et les lacunes sont définies à l'appendice 1 conformément à (45) (46). Il convient de consigner séparément les aberrations chromatidiques et chromosomiques et de les classer par sous-catégories (cassures, échanges). Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés sous le contrôle de pairs si nécessaire.

Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques structurales, il est important de rapporter la fréquence des cas de polyploïdie et d'endoreduplication lorsqu'ils se présentent. (Voir paragraphe 2.)

Compétence du laboratoire

Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des produits chimiques positifs de référence agissant selon des mécanismes variés, et avec plusieurs témoins négatifs (faisant appel à différents solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent une base de données historiques telle que définie au paragraphe 37.

Une sélection de produits chimiques utilisés comme témoins positifs (voir tableau 1, paragraphe 26) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter les produits chimiques clastogènes et pour déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique. Il conviendra de définir une plage de concentrations des produits chimiques sélectionnés qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

Le laboratoire doit établir:

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques,
- une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, de solvant) historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle 95 % de cette distribution (44) (47). La base de données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (48)), afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (44). On trouve dans la littérature (47) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des cellules présentant des aberrations chromosomiques issues d'une seule culture ou de l'ensemble des cultures réalisées en plusieurs exemplaires, comme décrit au paragraphe 21. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (44) (47). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 37) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

Le pourcentage de cellules présentant une/des aberration(s) structurale(s) doit être évalué. Les aberrations chromatidiques et chromosomiques classées par sous-catégorie (cassure, échange) doivent être consignées séparément, avec leur nombre et leur fréquence pour les cultures traitées et les cultures témoins. Les lacunes sont enregistrées et rapportées séparément, mais elles ne sont pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. Le pourcentage de cellules polyploïdes et/ou endoredupliquées est rapporté le cas échéant.

Il convient aussi d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et de les consigner pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs et positifs dans la ou les expériences principales sur les aberrations.

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

- Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 39).
- Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 26) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.
- Les critères de prolifération cellulaire dans le témoin de solvant doivent être remplis (paragraphe 17 et 18).
- Les trois conditions expérimentales ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphe 28).
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (paragraphe 31 et 21).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 22, 23 et 24.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 28):

- a) au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,
- c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 39).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (49) (50) (51).

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 28):

- a) aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,

- b) un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,
- c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 39).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou afin d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations, autres conditions d'activation métabolique (concentration de S9 ou origine de S9), par exemple].

Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif. Dans ce cas, la réponse au produit chimique d'essai sera considérée comme équivoque.

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations chromosomiques numériques (52). Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliques peut indiquer que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (53) (54) (voir paragraphe 2). La fréquence des cellules polyploïdes et des cellules présentant des chromosomes endoredupliques doit donc être consignée séparément.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si c'est disponible
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude
- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants

Solvant

- justification du choix du solvant;
- le pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final devrait aussi être indiqué.

Cellules:

- type et source des cellules utilisées;
- données sur le caryotype et raisons du choix du type de cellule utilisé;
- absence de mycoplasmes, pour les lignées cellulaires;
- pour les lignées cellulaires, informations sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération;
- sexe, âge et toute autre information pertinente sur les donateurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène employé;
- nombre de passages, le cas échéant, pour les lignées cellulaires;
- méthodes d'entretien des cultures, pour les lignées cellulaires;
- nombre modal de chromosomes, pour les lignées cellulaires.

Conditions de l'essai:

- identité de l'agent de blocage de métaphase, sa concentration et la durée de contact;
- concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);
- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;
- composition du milieu, concentration de CO₂ le cas échéant, degré d'humidité;
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture;
- température d'incubation;
- temps d'incubation;
- durée du traitement;
- délai de récolte après traitement;
- densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant;
- type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9);
- produits chimiques témoins positifs et négatifs, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement;
- méthodes de préparation des lames et technique de coloration utilisées;
- critères d'acceptabilité des essais;
- critères utilisés pour examiner les aberrations;
- nombre de métaphases analysées;
- méthodes de mesure de la cytotoxicité;
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats:

- nombre de cellules exposées et nombre de cellules récoltées pour chaque culture en cas de lignées cellulaires;
- mesures de la cytotoxicité, par exemple RPD, RICC, MI, autres observations le cas échéant;
- informations sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération en cas de lignées cellulaires;
- signes de précipitation et moment de la détermination;
- définition appliquée aux aberrations, y compris aux lacunes;
- nombre de cellules examinées, nombre de cellules présentant des aberrations et types d'aberration, donnés séparément pour chaque culture traitée et témoin, incluant et excluant les lacunes;
- modifications de la ploïdie (cellules polyploïdes et cellules présentant des chromosomes endoredupliqués, indiquées séparément) le cas échéant;
- relation concentration-réponse, si possible;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, et nombre de données;
- analyse statistique; valeurs P le cas échéant.

*Discussion des résultats.**Conclusions.*

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016), "Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015". Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.
- (2) Evans, H.J. (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), "The in Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), "Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- (6) Chapitre B.49 de la présente annexe: *Test du micronoyau in vitro sur cellules de mammifères.*
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

- (9) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (11) Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (12) Nessler, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.
- (14) Kirkland, D. et al. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1-256.
- (15) Greenwood, S. et al. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. et al. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316-326.
- (17) Hedner K. et al. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. et al. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- (19) Coecke S. et al. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- (20) Henderson, L. et al. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. et al. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (26) Elliot, B.M. et al. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.
- (27) Matsushima, T. et al. (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. et al. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. et al. (1994). Report from Working Group on in Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- (30) PNUE (2001), Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, Programme des Nations unies pour l'environnement (PNUE). Disponible à l'adresse: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooley (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- (38) Richardson, C. et al. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (39) OCDE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the in vitro mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) [ENV/JM/TG\(2014\)17](#). Disponible sur demande.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible à l'adresse: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OCDE (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE", Série sur les essais et l'évaluation, n° 198, OCDE, Paris.
- (45) ISCN (2013), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. et al. (1990), "Metaphase chromosome aberration assays in vitro", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- (47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (51) Richardson, C. et al. (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aberration de type chromatidique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur un même site.

Aberration numérique: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Aberration structurale: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose: mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC): augmentation du nombre de cellules dans les cultures exposées à un produit chimique par rapport aux cultures non traitées. Ratio exprimé en pourcentage.

Cassure de chromatide: interruption de la continuité d'une chromatide, manifestée par un défaut d'alignement clair de l'une des chromatides.

Clastogène: produit chimique induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations cellulaires ou des organismes eucaryotes.

Concentrations: désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai et utilisant des lignées cellulaires, la cytotoxicité correspond à une baisse du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 17 et appendice 2). Pour les essais visés par la présente méthode d'essai et utilisant des cultures primaires de lymphocytes, la cytotoxicité correspond à une baisse de l'indice mitotique (MI) des cellules exposées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 18 et appendice 2).

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD): augmentation du nombre de doublements de population dans les cultures exposées à un produit chimique par rapport aux cultures non traitées. Ratio exprimé en pourcentage.

Endoreduplication: processus selon lequel le noyau, après une période S de réplication de l'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une nouvelle période S. Il en résulte des chromosomes comptant 4, 8, 16,... chromatides.

Fraction S9 de foie: surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000 g (extrait de foie cru).

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications des nucléotides, réarrangements, mutations génétiques, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice mitotique (Mitotic Index, MI): nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération.

Lacune chromatidique: région non colorée (lésion achromatique) d'une seule chromatide pour laquelle on observe un défaut d'alignement minime de la chromatide.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Mitose: division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Polyploïdie: aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Prolifération cellulaire: augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Statut p53: la protéine p53 intervient dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Les cellules déficientes en protéine p53 fonctionnelle, incapables d'arrêter le cycle cellulaire ou d'éliminer les cellules lésées par le biais de l'apoptose ou d'autres mécanismes (induction de la réparation de l'ADN, par exemple) liés aux fonctions de p53 en réponse à des lésions de l'ADN, devraient théoriquement être davantage sujettes aux mutations génétiques ou aux aberrations chromosomiques.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Témoin de solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

Appendice 2

FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ

Indice mitotique (MI):

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules mitotiques}}{\text{Nombre total de cellules examinées}} \times 100$$

L'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) et le doublement relatif de la population (RPD) sont des mesures recommandées, qui tiennent compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées}(\text{final} - \text{initial}))}{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures témoins}(\text{final} - \text{initial}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures traitées})}{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures témoins})} \times 100$$

où:

Doublement de population = $[\log (\text{nombre de cellules post-application} \div \text{nombre de cellules initial})] \div \log 2$

Par exemple, une RICC ou un RPD de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 % et une cytotoxicité/cytostase de 55 % mesurée par le MI signifie que le MI réel représente 45 % du témoin.

Quoi qu'il en soit, il convient de mesurer le nombre de cellules avant traitement, qui doit être identique dans les cultures traitées et les cultures témoins négatives.

Le RCC (à savoir le ratio nombre de cellules dans les cultures traitées / nombre de cellules dans les cultures témoins) était utilisé auparavant comme paramètre de cytotoxicité, mais n'est plus recommandé car il peut induire une sous-estimation de la cytotoxicité.

Dans les cultures témoins négatives, le doublement de la population doit être compatible avec l'obligation de prélever des cellules à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement, et l'indice mitotique doit être assez élevé pour obtenir un nombre suffisant de cellules en mitose et calculer de façon fiable une réduction de 50 %.»

«B.11 Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 475 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succinctes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

L'essai d'aberration chromosomique in vivo sur moelle osseuse de mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme in vivo, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. L'essai in vivo est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système in vitro.

L'essai d'aberration chromosomique *in vivo* est destiné à identifier les produits chimiques d'essai qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (2) (3) (4) (5). Les aberrations structurales peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiques. Si la majorité des aberrations induites par des produits chimiques génotoxiques sont de type chromatidique, des aberrations chromosomiques se produisent aussi. Les lésions chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que, lorsque ces lésions et événements connexes frappent des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, ils jouent un rôle dans le cancer chez l'homme et dans les systèmes expérimentaux. Il est possible que des cas de polyploïdie (y compris d'endoreduplication) surviennent dans les essais d'aberration chromosomique *in vivo*. Or, une augmentation de la polyploïdie n'indique pas en soi le signe d'un potentiel aneugène et peut simplement indiquer une perturbation du cycle cellulaire ou une cytotoxicité. Cet essai n'est pas conçu pour mesurer l'aneuploïdie. Pour détecter l'aneuploïdie, il est recommandé de réaliser un test du micronoyau *in vivo* sur érythrocytes de mammifère (chapitre B.12 de la présente annexe) ou un test du micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères (chapitre B.49 de la présente annexe).

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai, mais dans certains cas, d'autres espèces peuvent convenir si cela est justifié sur le plan scientifique. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse, qui est un tissu très vascularisé formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et à traiter. L'utilisation d'une espèce autre que le rat ou la souris doit être scientifiquement justifiée dans le rapport. Si des animaux autres que des rongeurs sont utilisés, il est recommandé que la mesure des aberrations chromosomiques sur la moelle osseuse soit intégrée à un autre essai de toxicité pertinent.

Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que les substances chimiques d'essai, ou leurs métabolites, n'atteindront pas le tissu cible.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine et sont euthanasiés au moment approprié après le traitement. Avant l'euthanasie, les animaux sont traités avec un inhibiteur du fuseau (par exemple la colchicine ou le colcemide). Ensuite, les préparations chromosomiques faites à partir de cellules de la moelle osseuse sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

Épreuves de compétence

Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit démontrer sa capacité à reproduire les résultats attendus d'après les données publiées ((6), par exemple) concernant les fréquences d'aberrations chromosomiques, avec un minimum de deux substances chimiques témoins positifs (y compris des réponses faibles induites par des doses faibles de témoins positifs) tels que ceux énumérés au tableau 1 et avec des témoins de véhicule/solvant compatibles (voir paragraphe 22). Les doses utilisées dans le cadre de ces expériences doivent produire des augmentations reproductibles qui sont fonction de la dose administrée, et démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai sur le tissu en question (moelle osseuse); la méthode d'analyse retenue doit être celle qui sera employée par le laboratoire. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 10 à 14.

Données des témoins historiques

Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire devra établir:

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques, et
- une plage et une distribution des témoins négatifs historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit être statistiquement robuste pour permettre au laboratoire d'évaluer la distribution de ses données des témoins négatifs. La littérature suggère qu'un minimum de 10 expériences peut-être nécessaire, sachant qu'il serait préférable d'en compter au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Le laboratoire doit avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (7)), afin de déterminer la variabilité de ses données et de démontrer sa maîtrise de la méthodologie. On trouve dans la littérature (8) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Si, au cours des expériences visant à vérifier sa compétence (comme décrit au paragraphe 9), le laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution des témoins négatifs statistiquement robuste (voir paragraphe 11), on peut accepter que la distribution soit construite au cours des premiers tests de routine. Cette approche devra suivre les recommandations établies dans la littérature (8) et les résultats des témoins négatifs obtenus lors de ces expériences devront être cohérents avec les données publiées des témoins négatifs.

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée à la lumière de ses répercussions sur la cohérence des nouvelles données avec celles de la base de données des témoins historiques. Seules des incohérences majeures justifient l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques, après confirmation de la différence de distribution des données par des experts (voir paragraphe 11). Lors de la constitution de cette nouvelle base de données, le laboratoire n'a pas forcément besoin d'une base de données de témoins négatifs complète pour autoriser la conduite d'un essai, à condition qu'il puisse apporter la preuve que les valeurs des témoins négatifs concomitants sont cohérentes avec la précédente base de données ou avec les données publiées correspondantes.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) chez chaque animal. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes, et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 11) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les rats sont habituellement utilisés, mais les souris peuvent également convenir. Toute autre espèce appropriée de mammifère peut être employée à condition qu'une justification scientifique de ce choix soit donnée dans le rapport.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C (\pm 3°C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus de même sexe (cinq au maximum par cage) recevant le même traitement, si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

On choisit habituellement de jeunes animaux adultes sains (les rongeurs sont idéalement âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables), qui sont répartis de manière aléatoire entre les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser \pm 20 pour cent du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Solvant/véhicule:

Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées ni interagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données historiques ou publiées montrant que le véhicule/solvant inhabituel sélectionné n'induit aucune aberration structurale ou effet délétère, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin de solvant/véhicule.

Témoins

Témoins positifs

Chaque essai doit normalement inclure un groupe d'animaux traités avec une substance chimique utilisée comme témoin positif. Cette étape peut être évitée une fois que le laboratoire d'essai a apporté la preuve de ses compétences pour la conduite de l'essai et établi la plage des témoins positifs historiques. Lorsqu'aucun groupe témoin concomitant n'est utilisé simultanément, des témoins d'examen (lames fixes et non colorées) devront être inclus dans chaque expérience. Pour ce faire, on pourra intégrer à l'étape d'examen des échantillons de référence idoines obtenus et stockés lors d'un essai séparé sur témoin positif mené périodiquement (par exemple, tous les 6 à 18 mois) dans le laboratoire dans lequel l'essai est conduit, notamment au cours de l'épreuve de compétence et par la suite sur une base régulière, si nécessaire.

Les substances utilisées comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques par rapport au niveau spontané. Les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examineur. Il est possible d'administrer le témoin positif par une voie différente de celle du produit chimique d'essai, de suivre un autre programme de traitement et de n'effectuer qu'un seul prélèvement d'échantillon. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'il y a lieu. Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs

Substance chimique	N° CAS
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0
Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
Ethylnitrosourée	759-73-9]
Mitomycine C	50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydratée)	50-18-0 (6055-19-2)
Triéthylènemélatamine	CAS 51-18-3

Témoins négatifs

Pour chaque moment d'échantillonnage, il faut inclure un groupe d'animaux témoins négatifs, qui seront manipulés de la même façon que les groupes traités, mais ne recevront pas le produit chimique d'essai. Si un solvant/véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, ce solvant/véhicule doit être administré au groupe témoin. Toutefois, si des résultats obtenus antérieurement par le laboratoire d'essai démontrent que la variabilité interindividuelle et la fréquence des cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins négatifs sont stables pour chaque moment d'échantillonnage, un seul prélèvement peut alors suffire pour les témoins négatifs. Dans ce cas, il doit intervenir au moment du premier prélèvement effectué dans le cadre de l'étude.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles (9), et il est à prévoir qu'il en sera de même pour les aberrations chromosomiques structurales; la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité, de toxicité sur la moelle osseuse, etc comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'appendice 2.

La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe, ou de chaque sexe si les deux sont utilisés. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude sur moelle osseuse comptant deux moments d'échantillonnage et impliquant trois groupes de traitement et un groupe de témoins négatifs concomitants, plus un groupe de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera 45 animaux.

Niveaux de dose

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (10). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, induisant une baisse du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux (11).

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme celle qui donne lieu à certains symptômes de toxicité pour la moelle osseuse.

Les substances chimiques dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas.

Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (moelle osseuse) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques d'essai (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques.

Essai limite

Si les essais préliminaires de détermination des doses ou les données existantes concernant des souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (décrite ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables (notamment aucune dépression de la fonction médullaire osseuse ni autre cytotoxicité pour le tissu cible), et si la génotoxicité n'est pas escomptée d'après des études de génotoxicité in vitro ou d'après les données relatives aux substances structurellement apparentées, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire, à condition qu'il ait été démontré que le/les produit(s) chimiques d'essai atteignent le tissu cible (moelle osseuse). Dans ce cas, un seul niveau de dose, égal à la dose limite, peut s'avérer suffisant. Pour une période d'administration de plus de 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration de 14 jours ou moins, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intra-trachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphes 33 et 34). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants doit être justifiée. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, afin de garantir l'administration d'un volume constant pour un poids corporel donné, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

Programme de traitement

En règle générale, les produits chimiques d'essai sont administrés en une seule fois, mais si le volume est important, l'administration peut être fractionnée (à raison de deux traitements ou plus le même jour à intervalles de 2 à 3 heures maximum). En pareil cas, ou lors d'une administration du produit chimique d'essai par inhalation, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction, ou de la fin de l'exposition.

On ne dispose guère de données sur la pertinence d'un protocole de doses répétées pour cet essai. Cependant, dans les cas où il est conseillé d'intégrer cet essai à un essai de toxicité à doses répétées, il faut prendre soin d'éviter la perte de cellules mitotiques présentant des lésions chromosomiques, un phénomène susceptible de se produire à des doses toxiques. Une telle intégration est acceptable lorsque la dose la plus élevée est supérieure ou égale à la dose limite (voir paragraphe 29) et que cette dose limite est administrée à un groupe de traitement pendant toute la durée du traitement. Il convient de considérer le test du micronoyau (méthode d'essai B.12) comme le test *in vivo* de première intention pour la détection des aberrations chromosomiques lorsqu'une intégration à d'autres études est souhaitée.

Les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés à deux moments différents à la suite de chaque traitement. Pour les rongeurs, le premier intervalle de prélèvement se situe à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures après le traitement). Étant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation des produits chimiques d'essai ainsi que leur effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal pour la détection des aberrations chromosomiques, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Au premier moment d'échantillonnage, tous les groupes de traitement doivent être traités et des échantillons collectés pour analyse; cependant, lors du/des prélèvement(s) ultérieur(s), seule la dose la plus élevée doit être administrée. Si l'on applique des programmes de traitement qui couvrent plus d'une journée sur justification scientifique, l'échantillonnage devrait normalement intervenir à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après la fin du traitement.

Après le traitement et avant le prélèvement des échantillons, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemide ou la colchicine) par injection intrapéritonéale et les prélèvements sont ensuite effectués dans un délai approprié, qui est de 3 à 5 heures environ pour la souris et de 2 à 5 heures pour le rat. Les cellules sont prélevées dans la moelle osseuse, dilatées, fixées et colorées, puis analysées en vue de détecter des aberrations chromosomiques (12).

Observations

Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (11).

Exposition du tissu cible

Lorsque cela se justifie et qu'il n'existe pas d'autres données sur l'exposition (voir paragraphe 44), il convient de réaliser un prélèvement sanguin au(x) moment(s) idoine(s) pour vérifier la concentration des produits chimiques d'essai dans le plasma afin de démontrer que la moelle osseuse a bien été exposée.

Préparation de la moelle osseuse et des chromosomes

Les cellules de moelle osseuse sont obtenues à partir des fémurs ou des tibias des animaux immédiatement après l'euthanasie, exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules en métaphase sont ensuite étalées sur des lames et colorées selon des méthodes éprouvées (voir (3) (12)).

Analyse

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse et randomisées afin que l'analyste ignore à quel traitement elles correspondent.

L'indice mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et doit être déterminé dans un minimum de 1 000 cellules pour tous les animaux traités (témoins positifs compris) et les animaux non traités ou témoins de véhicule/solvant.

Un minimum de 200 métaphases par animal doit être analysé pour détecter les aberrations chromosomiques, lacunes comprises et non comprises (6). Cependant, si la base de données des témoins négatifs historiques indique une fréquence de fond moyenne des aberrations chromosomiques structurelles < 1 % dans le laboratoire, il convient d'envisager l'examen de cellules supplémentaires. Les aberrations de type chromatidique et chromosomique doivent être consignées séparément et classées par sous-types (cassures, échanges). Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés, sous le contrôle de pairs si nécessaire. Étant donné que les procédures de préparation des lames provoquent souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal ou supérieur à $2n \pm 2$, n étant le nombre haploïde de chromosomes pour cette espèce.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'indice mitotique, le nombre de cellules en métaphase examinées, le nombre d'aberrations par cellule en métaphase ainsi que le pourcentage de cellules présentant une/des aberration(s) chromosomique (s) structurale(s) doivent être indiqués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques structurales doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes de traitement et témoins. Les lacunes, ainsi que les cellules polyploïdes et présentant des chromosomes endoredupliqués sont notées séparément. La fréquence des lacunes est rapportée mais n'est généralement pas incluse dans l'analyse de la fréquence totale des aberrations. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles aussi figurer dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

- a) Les données relatives aux essais témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins historiques du laboratoire (voir paragraphes 11 à 14);
- b) Les témoins positifs ou témoins d'examen concomitants doivent induire des réponses compatibles avec celles générées par les témoins positifs figurant dans la base de données historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 20 — 21);
- c) Le nombre idoine de doses et de cellules est analysé;
- d) Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 25 à 28.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

- a) au moins un des groupes de traitement présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) par rapport aux témoins négatifs concomitants,
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments d'échantillonnage,
- c) les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Si seule la dose la plus élevée est étudiée à un moment d'échantillonnage particulier, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si on constate une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants et que les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson). Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (13). Une analyse de la relation dose-réponse doit porter sur un minimum de trois groupes de traitement. Les méthodes statistiques doivent utiliser l'animal comme unité expérimentale. Des résultats positifs obtenus dans un essai d'aberration chromosomique indiquent qu'un produit chimique d'essai induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

- a) aucun des groupes de traitement ne présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) par rapport aux témoins négatifs concomitants,

- b) un test de tendance approprié montre qu'à aucun des moments d'échantillonnage, il n'y a d'augmentation liée à la dose,
- c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson) et,
- d) il y a bien eu exposition de la moelle osseuse à la / aux substance(s) chimique(s) d'essai.

Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (13). L'exposition de la moelle osseuse à une substance chimique d'essai peut être démontrée par une baisse de l'indice mitotique ou par la mesure de la concentration de la/des substance(s) chimique(s) d'essai dans le plasma ou le sang. Dans le cas d'une administration par voie intraveineuse, des preuves de l'exposition ne sont pas requises. Pour démontrer l'exposition de la moelle osseuse, on peut également avoir recours aux données ADME, obtenues dans le cadre d'une étude indépendante employant la même voie d'administration et la même espèce. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, le produit chimique d'essai n'induit pas d'aberrations chromosomiques structurales dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse positive claire ou négative claire.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées sur les expériences déjà réalisées. Dans certains cas, il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires ou de répéter l'expérience en modifiant les conditions expérimentales.

Dans de rares cas, même après des investigations complémentaires, les données ne permettront pas de conclure que le produit chimique d'essai provoque des résultats clairement positifs ou négatifs. Les résultats de l'étude seront alors considérés comme équivoques.

La fréquence de métaphases polyploïdes et endoredupliquées par rapport au nombre total de métaphases doit être consignée séparément. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes/endoredupliquées peut signifier que la substance d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques ou la progression du cycle cellulaire (voir paragraphe 3).

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Résumé

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

- justification du choix du véhicule;
- solubilité et stabilité du produit chimique testé dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;
- préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

Animaux d'essai:

- espèces/souches utilisées et justification;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;
- méthode d'identification individuelle des animaux;
- pour les études de courte durée: poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions expérimentales:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);
- données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée;
- justification du choix des doses;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai;
- justification de la voie et de la durée d'administration;
- méthodes utilisées pour vérifier que la/les substance(s) chimique(s) d'essai a/ont atteint la circulation générale ou la moelle osseuse;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;
- méthode d'euthanasie;
- méthode d'analgésie (le cas échéant);
- description détaillée des calendriers de traitement et d'échantillonnage et justification des choix;
- méthodes de préparation des lames;
- méthodes d'évaluation de la toxicité;
- nature et concentration du produit chimique utilisé pour bloquer la métaphase, dose et heure d'administration avant le prélèvement;
- procédures d'isolement et de conservation des échantillons;
- critères d'analyse des aberrations;

- nombre de cellules en métaphase analysées par animal et nombre de cellules analysées pour déterminer l'indice mitotique;
- critères d'acceptabilité de l'étude;
- critères permettant de conclure que les résultats de l'étude sont positifs, négatifs ou équivoques.

Resultats:

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;
- indice mitotique, donné séparément pour chaque animal;
- type et nombre d'aberrations et de cellules aberrantes, donnés séparément pour chaque animal;
- nombre total d'aberrations par groupe, moyenne et écart-type;
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyenne et écart-type;
- modifications de la ploïdie, le cas échéant, y compris les fréquences de polyploïdes et/ou de cellules endoredupliquées;
- relation dose-réponse, si possible;
- analyses et méthodes statistiques employées;
- données mettant en évidence une exposition de la moelle osseuse;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs concomitants, y compris les plages, moyennes et écarts-types;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs historiques, y compris les plages, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, ainsi que période couverte et nombre d'observations;
- critères remplis pour une réponse positive ou négative.

Discussion des résultats.

Conclusions.

Références.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016), "Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015". Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. et al. (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305-312.

- (6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19-30.
 - (7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
 - (8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
 - (9) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
 - (10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.
 - (11) OCDE (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n°19, OCDE, Paris.
 - (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147-163.
 - (13) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non de multiples d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (cf. polyploïdie).

Centromère: régions d'un chromosome auxquelles les fibrilles du fuseau sont associées pendant la division de la cellule et qui permettent le mouvement ordonné des chromosomes-filles vers les pôles des cellules-filles.

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Aberration de type chromatidique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication: processus par lequel le noyau, après une période S de réplication de l'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une nouvelle période S. Il en résulte des chromosomes comptant 4, 8, 16,... chromatides.

Lacune: lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, marquée par un défaut d'alignement minime des chromatides.

Indice mitotique: ratio entre le nombre de cellules en mitose et le nombre total de cellules dans une population, donnant une mesure de la vitesse de prolifération de cette population de cellules.

Aberration numérique: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des animaux employés (aneuploïdie).

Polyploïdie: aberration chromosomique numérique se traduisant par une modification du nombre de jeux de chromosomes, et non par une modification numérique touchant une partie du jeu de chromosomes (cf. aneuploïdie).

Aberration chromosomique structurale: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

*Appendice 2***PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER LES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS L'ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE IN VIVO****Plan factoriel et analyse factorielle**

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires).

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux logiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA ⁽¹⁾. En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. et Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable; toutefois, ils n'obtiendront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui date des approches algorithmiques du calcul statistique développées à l'ère pré-informatique.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.»

«B.12 Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 474 (2016) de l'OCDE. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succinctes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

Ce test du micronoyau pratiqué *in vivo* chez les mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité, car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. Le test est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système *in vitro*.

Le test du micronoyau *in vivo* est pratiqué chez des mammifères en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il évalue la formation de micronoyaux dans des érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.

Le test du micronoyau a pour but d'identifier les produits chimiques qui engendrent des lésions cytogénétiques induisant la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes retardataires ou des chromosomes entiers.

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection de micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite.

Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique. L'utilisation d'une plateforme d'analyse automatique facilite considérablement le dénombrement d'un nombre suffisant d'érythrocytes immatures dans le sang périphérique ou la moelle osseuse d'animaux adultes. Ce type de plateforme constitue une alternative acceptable à l'évaluation manuelle (2). D'après des études comparatives, de telles méthodes, couplées à l'utilisation de normes d'étalonnage idoines, offrent une reproductibilité et une sensibilité inter-laboratoires et intra-laboratoire supérieures aux performances de l'examen manuel au microscope (3) (4). Parmi les systèmes automatisés pouvant mesurer la fréquence des érythrocytes micronucléés, on peut citer les cytomètres en flux (5), les plateformes d'analyse d'images (6) (7) et les cytomètres à balayage laser (8).

Bien que cela ne fasse habituellement pas partie de l'essai, les fragments de chromosomes peuvent être distingués des chromosomes entiers d'après un certain nombre de critères. Ceux-ci comprennent la détection de la présence ou de l'absence de kinétochore ou d'ADN centromérique, tous deux étant caractéristiques d'un chromosome intact. L'absence de kinétochore ou d'ADN centromérique indique que le micronoyau ne contient que des fragments de chromosomes, tandis que la présence de l'un de ces éléments signe une perte chromosomique.

Les définitions des termes employés figurent à l'appendice 1

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

La moelle osseuse de jeunes rongeurs adultes est le tissu cible des lésions génétiques dans le cadre de cet essai, les érythrocytes étant produits dans ce tissu. Le comptage des érythrocytes immatures micronucléés dans le sang périphérique peut aussi être effectué chez d'autres espèces de mammifères qui ont démontré une sensibilité suffisante pour permettre la détection de produits chimiques provoquant des aberrations chromosomiques structurales ou numériques dans ces cellules (par induction de micronoyaux dans les érythrocytes immatures), et à condition que ce choix soit justifié sur le plan scientifique. La fréquence des érythrocytes immatures micronucléés est le principal effet mesuré. Il est également possible de mesurer la fréquence des érythrocytes matures micronucléés dans le sang périphérique chez les espèces ne présentant pas une forte sélection splénique contre les cellules micronucléées et lorsque les animaux sont traités en continu pendant une période supérieure à la durée de vie d'un érythrocyte chez l'espèce concernée (par exemple, quatre semaines au moins chez la souris).

Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le/les produit(s) chimique(s) d'essai, ou leur(s) métabolite(s), n'atteindront pas le tissu cible.

Avant d'utiliser la méthode d'essai pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Si l'on utilise la moelle osseuse, les animaux sont euthanasiés au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement; la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement; les préparations sont ensuite réalisées et colorées (12) (16) (17) (18). Lors d'une administration aiguë du traitement, il importe d'effectuer le prélèvement de moelle osseuse ou de sang périphérique à un moment où l'induction d'érythrocytes immatures micronucléés par le traitement peut être détectée. Dans le cas d'un prélèvement de sang périphérique, un laps de temps suffisant doit s'être écoulé pour que ces éléments apparaissent dans la circulation sanguine. Les préparations sont analysées en vue de la détection de micronoyaux, par visualisation directe à l'aide d'un microscope, par analyse d'image, par cytométrie en flux ou par cytométrie à balayage laser.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

Épreuves de compétence

Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir démontré sa capacité à reproduire les résultats attendus d'après les données publiées (17) (19) (20) (21) (22) concernant les fréquences de micronoyaux avec un minimum de deux produits chimiques témoins positifs (y compris des réponses faibles induites par des doses faibles de témoins positifs) tels que ceux énumérés au tableau 1, et avec des témoins de véhicule/solvant compatibles (voir paragraphe 26). Les doses utilisées dans le cadre de ces expériences doivent produire des augmentations reproductibles qui sont fonction de la dose administrée, et démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai sur le tissu en question (moelle osseuse ou sang périphérique); la méthode d'analyse retenue doit être celle qui sera employée par le laboratoire. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 14 à 18.

Données des témoins historiques

Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire devra établir:

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques, et
- une plage et une distribution des témoins négatifs historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit être statistiquement robuste pour permettre au laboratoire d'évaluer la distribution de ses données des témoins négatifs. La littérature suggère qu'un minimum de 10 expériences peut-être nécessaire, sachant qu'il serait préférable d'en compter au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (23)), afin de déterminer la variabilité de leurs données et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie. On trouve dans la littérature (24) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Si, au cours des expériences visant à vérifier sa compétence (comme décrit au paragraphe 13), le laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution des témoins négatifs statistiquement robuste (voir paragraphe 15), on peut accepter que la distribution soit construite au cours des premiers tests de routine. Cette approche devra suivre les recommandations établies dans la littérature (24) et les résultats des témoins négatifs obtenus lors de ces expériences devront être cohérents avec les données publiées des témoins négatifs.

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée à la lumière de ses répercussions sur la cohérence des nouvelles données avec celles de la base de données des témoins historiques. Seules des incohérences majeures justifient l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques, après confirmation de la différence de distribution des données par des experts (voir paragraphe 15). Lors de la constitution de cette nouvelle base de données, le laboratoire n'a pas forcément besoin d'une base de données de témoins négatifs complète pour autoriser la conduite d'un essai, à condition qu'il puisse apporter la preuve que les valeurs des témoins négatifs concomitants sont cohérentes avec la précédente base de données ou avec les données publiées correspondantes.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des érythrocytes immatures micronucléés chez chaque animal. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 15) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Sélection des espèces animales

Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches courantes de laboratoire. On pourra choisir des souris, des rats, ou toute autre espèce de mammifère appropriée. Si l'examen porte sur le sang périphérique, il doit être établi que l'élimination par la rate des cellules micronucléées ne compromet pas la détection des micronoyaux induits chez l'espèce sélectionnée. Cela a été clairement démontré pour le sang périphérique chez la souris et le rat (2). L'utilisation d'une espèce autre que le rat ou la souris doit être scientifiquement justifiée dans le rapport. Si des animaux autres que des rongeurs sont utilisés, il est recommandé que la mesure des micronoyaux induits soit intégrée à un autre essai de toxicité pertinent.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C (\pm 3°C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus de même sexe (cinq au maximum par cage) recevant le même traitement, si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié du point de vue scientifique.

Préparation des animaux

On choisit habituellement de jeunes animaux adultes sains (les rongeurs sont idéalement âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables), qui sont répartis de manière aléatoire entre les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser \pm 20 % du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai

Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données historiques ou publiées significatives montrant qu'aucun micronoyau ou effet délétère n'est induit par un solvant/véhicule inhabituel sélectionné, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin pour le solvant/véhicule.

Témoins

Témoins positifs

Chaque essai doit normalement inclure un groupe d'animaux traités avec un produit chimique utilisé comme témoin positif. Cette étape peut être évitée une fois que le laboratoire d'essai a apporté la preuve de ses compétences pour la conduite de l'essai et établi la plage des témoins positifs historiques. Lorsqu'aucun groupe témoin positif n'est utilisé simultanément, des témoins d'examen (lames fixées et non colorées ou échantillons de suspension cellulaire, selon les besoins de la méthode d'examen) devront être inclus dans chaque expérience. Pour ce faire, on pourra intégrer à l'étape d'examen des échantillons de référence idoines obtenus et stockés lors d'un essai séparé sur témoin positif mené périodiquement (par exemple, tous les 6 à 18 mois), notamment au cours de l'épreuve de compétence et par la suite sur une base régulière, si nécessaire.

Les produits chimiques utilisés comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des micronoyaux par rapport au niveau spontané. Si l'examen est effectué manuellement au microscope, les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examineur. Il est possible d'administrer le témoin positif par une voie différente de celle du produit chimique d'essai, de suivre un autre programme de traitement et de n'effectuer qu'un seul prélèvement d'échantillon. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'il y a lieu. Des exemples de produits chimiques utilisés comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Exemples de produits chimiques utilisés comme témoins positifs

Produit chimique et n°CAS
Méthanesulfonate d'éthyle [n°CAS 62-50-0]
Méthanesulfonate de méthyle [n°CAS 66-27-3]
Ethylnitrosourée [n°CAS 759-73-9]
Mitomycine C [n°CAS 50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydratée) [n°CAS 50-18-0 (n°CAS 6055-19-2)]
Triéthylènemélatamine [n°CAS 51-18-3]
Colchicine [n°CAS 64-86-8] ou vinblastine [n°CAS 865-21-4] — comme aneugènes

Témoins négatifs

Pour chaque moment d'échantillonnage, il faut inclure un groupe d'animaux témoins négatifs, qui seront manipulés de la même façon que les groupes traités, mais ne recevront pas le produit chimique d'essai. Si un solvant/véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, ce solvant/véhicule doit être administré au groupe témoin. Toutefois, si des résultats obtenus antérieurement par le laboratoire d'essai démontrent que la variabilité interindividuelle et la fréquence des cellules comportant des micronoyaux provenant de témoins négatifs sont stables pour chaque moment d'échantillonnage, un seul échantillonnage peut alors suffire pour les témoins négatifs. Dans ce cas, il doit intervenir au moment du premier prélèvement effectué dans le cadre de l'étude.

Si le sang périphérique est utilisé, un échantillon prélevé avant le traitement peut aussi tenir lieu de témoin négatif pour les études de courte durée, lorsque les résultats sont conformes aux valeurs de la base de données des témoins historiques du laboratoire. Il a été démontré chez le rat que le prélèvement de faibles volumes (par exemple, inférieurs à 100 µl/jour) avant le traitement avait un impact minime sur la fréquence de fond des micronoyaux (25).

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles (26), et la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité de la toxicité sur la moelle osseuse, etc. comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'appendice 2.

La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude sur moelle osseuse conduite selon les paramètres établis au paragraphe 37, impliquant trois groupes de traitement et des groupes de témoins négatifs et de témoins positifs concomitants (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera entre 25 et 35 animaux.

Niveaux de dose

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (27). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, induisant une baisse du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique, mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux (28)).

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme la dose qui produit une toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50 % de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique, sans que cette proportion devienne inférieure à moins 20 % de la valeur témoin). Toutefois, l'analyse des cellules positives au marqueur CD71 dans la circulation sanguine périphérique (par cytométrie en flux) révèle que cette fraction d'érythrocytes immatures très jeunes répond plus rapidement aux substances toxiques que la cohorte plus importante d'érythrocytes immatures positifs à l'ARN. Par conséquent, la toxicité peut apparaître supérieure dans le cadre d'expériences prévoyant une exposition aiguë suivie de l'examen des érythrocytes immatures positifs au marqueur CD71 par rapport aux dispositifs d'essai qui recensent les érythrocytes immatures en fonction de leur contenu ARN. Pour cette raison, lorsque l'expérience prévoit cinq jours de traitement ou moins, la dose la plus élevée du produit chimique d'essai entraînant une toxicité peut se définir comme la dose causant une réduction statistiquement significative de la proportion d'érythrocytes positifs au marqueur CD71 par rapport au total des érythrocytes, sans descendre en dessous de 5 % de la valeur témoin (29).

Les produits chimiques d'essai dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détérioration pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évalués au cas par cas.

Pour obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, séparés en règle générale par un facteur de 2, et de 4 au maximum. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses à administrer, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée par période d'administration de 14 jours ou plus doit être de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour. En revanche, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (moelle osseuse) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques.

Essai limite

Si les essais préliminaires de détermination des doses ou les données existantes concernant des souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (décrite ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables (notamment aucune dépression de la fonction médullaire osseuse ni autre cytotoxicité pour le tissu cible), et si la génotoxicité n'est pas escomptée d'après des études de génotoxicité in vitro ou d'après les données relatives aux produits chimiques structurellement apparentés, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire, à condition qu'il ait été démontré que les produits chimiques d'essai atteignent le tissu cible (moelle osseuse). Dans ce cas, un seul niveau de dose, égal à la dose limite, peut s'avérer suffisant. Pour une période d'administration égale ou supérieure à 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intra-trachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphe 37). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants doit être justifiée. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, afin de garantir l'administration d'un volume constant pour un poids corporel donné, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

Programme de traitement

On réalisera de préférence deux traitements ou plus, administrés à des intervalles de 24 heures, notamment lorsque l'essai est intégré à d'autres études de toxicité. Alternativement, on pourra administrer des traitements simples, si cela s'avère scientifiquement justifié (par exemple dans le cas de produits chimiques d'essai connus pour bloquer le cycle cellulaire). L'administration du produit chimique d'essai peut aussi être fractionnée, à raison de deux traitements le même jour à intervalle de deux à trois heures maximum, afin de faciliter l'administration d'un grand volume. En pareil cas, ou lors d'une administration du produit chimique d'essai par inhalation, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction, ou de la fin de l'exposition.

L'essai peut être réalisé chez la souris ou le rat de trois manières différentes:

- a. Le produit chimique d'essai est administré en une seule fois aux animaux. Des échantillons de moelle osseuse sont prélevés au moins deux fois (sur des groupes d'animaux indépendants), au plus tôt 24 heures et au plus tard 48 heures après le traitement, à intervalle(s) approprié(s), sauf s'il est avéré que la demi-vie du produit chimique d'essai est particulièrement longue. Les prélèvements effectués moins de 24 heures après le traitement doivent être justifiés. Les échantillons du sang périphérique sont prélevés au moins deux fois (sur le même groupe d'animaux), au plus tôt 36 heures et au plus tard 72 heures après le traitement, à intervalles appropriés. Au premier moment d'échantillonnage, tous les groupes de traitement doivent être traités et des échantillons collectés pour analyse; cependant, lors du/des prélèvement(s) ultérieur(s), seule la dose la plus élevée doit être administrée. Dès qu'une réponse positive est obtenue, il est inutile de poursuivre les prélèvements, sauf si l'on a besoin d'obtenir des informations quantitatives sur la relation dose-réponse. Les intervalles de prélèvement décrits découlent de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans ces deux compartiments tissulaires.
- b. Lorsque deux traitements sont administrés (par exemple deux traitements à 24 heures d'intervalle), les échantillons doivent être prélevés une seule fois, entre 18 et 24 heures après le traitement final dans le cas de la moelle osseuse, et entre 36 et 48 heures dans celui du sang périphérique (30). Les intervalles de prélèvement décrits découlent de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans ces deux compartiments tissulaires.
- c. Si trois traitements, ou davantage, sont administrés (par exemple trois traitements ou plus à environ 24 heures d'intervalle), les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés au plus tard 24 heures après le traitement final, et ceux de sang périphérique au plus tard 40 heures après le dernier traitement (31). Ce régime de traitement permet de combiner le test des comètes (par exemple, prélèvement 2 à 6 heures après le dernier traitement) et le test du micronoyau, ainsi que d'intégrer le test du micronoyau à des études de toxicité par administration répétée. D'après les données disponibles, l'induction de micronoyaux peut s'observer sur ces délais allongés après trois administrations de traitement, ou davantage (15).

D'autres régimes de traitement ou de prélèvement peuvent être envisagés le cas échéant et sous réserve qu'ils soient scientifiquement justifiés, ainsi que pour faciliter l'intégration avec d'autres essais de toxicité.

Observations

Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (28). Dans certaines circonstances, la température corporelle des animaux peut être surveillée, une hyper- ou une hypothermie causée par le traitement pouvant fausser les résultats (32) (33) (34).

Exposition du tissu cible

Lorsque cela se justifie et qu'il n'existe pas d'autres données sur l'exposition (voir paragraphe 48), il convient de réaliser un prélèvement sanguin au(x) moment(s) idoine(s) pour vérifier la concentration des produits chimiques d'essai dans le plasma afin de démontrer que la moelle osseuse a bien été exposée.

Préparation de la moelle osseuse et du sang

Les cellules de moelle osseuse sont généralement obtenues à partir des fémurs ou tibias des animaux, immédiatement après l'euthanasie. Le plus souvent, les cellules sont extraites, préparées et colorées suivant des méthodes bien établies. De faibles volumes de sang périphérique peuvent être prélevés, conformément aux normes en vigueur en matière de bien-être animal, soit selon une méthode permettant la survie de l'animal d'essai (par exemple prélèvement dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié), soit par ponction cardiaque ou prélèvement sur un vaisseau sanguin principal, après l'euthanasie de l'animal. Pour les érythrocytes provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique, suivant la méthode d'analyse, on peut effectuer immédiatement une coloration supravitale des cellules sanguines (16) (17) (18) ou des frottis qui sont ensuite colorés pour analyse microscopique, ou fixés puis colorés de manière idoine pour analyse par cytométrie en flux. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN [par exemple, l'acridine orange (35) ou l'Hoechst 33258 avec la pyronine-Y (36)] peut éliminer une partie des artefacts associés à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'utilisation de colorants classiques (par exemple le Giemsa pour l'analyse microscopique). D'autres méthodes, faisant par exemple appel à des colonnes de cellulose pour retirer les cellules nucléées (37) (38), peuvent être utilisées à condition que leur compatibilité avec la préparation d'échantillon dans le laboratoire ait été démontrée.

Lorsque ces méthodes sont applicables, les anticorps anti-kinétochore (39), la méthode FISH associée à des sondes ADN pancentromériques (40) ou encore le marquage in situ par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié (41), peuvent être utilisés pour identifier le contenu (chromosomes/fragments chromosomiques) des micronoyaux afin de déterminer si le mécanisme d'induction des micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène. D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée.

Analyse (manuelle et automatique)

Toutes les lames et échantillons, y compris ceux des témoins positifs et négatifs, doivent être codés individuellement avant tout type d'analyse, et doivent être randomisés afin que l'analyste ne puisse pas connaître le traitement utilisé. Ce codage est inutile si l'on fait appel à un système d'analyse automatique, auquel cas l'analyse ne s'appuie pas sur un examen visuel et ne peut être affectée par un biais de l'opérateur. Pour chaque animal, on détermine la proportion d'érythrocytes immatures dans le nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) en comptant au moins 500 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 2 000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (42). L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés est déterminée sur la base de l'examen d'au moins 4 000 érythrocytes immatures par animal (43). Si la base de données des témoins négatifs historiques indique une fréquence de fond moyenne des érythrocytes immature micronucléés < 0,1 % dans le laboratoire, il convient d'envisager l'examen de cellules supplémentaires. À l'examen des lames, le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes chez les animaux traités ne doit pas être inférieur à 20 % de cette valeur pour les témoins de véhicule/solvant lors de l'analyse microscopique, et pas inférieur à environ 5 % de cette valeur pour les témoins de véhicule/solvant lors de l'analyse par cytométrie des érythrocytes immatures positifs au marqueur CD71 (voir paragraphe 31) (29). Par exemple, pour un essai sur moelle osseuse avec examen microscopique, si la proportion témoin d'érythrocytes immatures dans la moelle osseuse est de 50 %, la limite supérieure de toxicité équivaldra à 10 % d'érythrocytes immatures.

Étant donné que la rate de rat immobilise et détruit les érythrocytes micronucléés, pour maintenir la sensibilité de l'essai lors de l'analyse du sang périphérique chez le rat, il est préférable de circonscrire l'analyse aux érythrocytes immatures micronucléés les plus jeunes. En cas d'utilisation de méthodes d'analyse automatique, ces érythrocytes les plus immatures peuvent être repérés grâce à leur contenu élevé en ARN, ou au niveau élevé de récepteurs de la transferrine (positifs au marqueur CD71) exprimés à leur surface (31). Toutefois, une comparaison directe des différentes méthodes de coloration a révélé que plusieurs méthodes permettaient d'obtenir des résultats satisfaisants, y compris la méthode classique de coloration à l'acridine orange (3) (4).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micronucléés et la proportion d'érythrocytes immatures doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Si des souris sont traitées en continu pendant au moins quatre semaines, il convient de fournir également les données relatives au nombre et à la proportion d'érythrocytes matures micronucléés, si elles ont été recueillies. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles-aussi être consignées.

Critères d'acceptabilité

Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

- a. Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins historiques du laboratoire (voir paragraphes 15 à 18).
- b. Les témoins positifs ou témoins d'examen concomitants doivent induire des réponses compatibles avec celles générées par les témoins positifs et figurant dans la base de données historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 24 et 25).
- c. Le nombre idoine de doses et de cellules est analysé.
- d. Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 30 à 33.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

- a. au moins un des groupes de traitement présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés par comparaison avec le témoin négatif concomitant,
- b. un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments d'échantillonnage,
- c. des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Si seule la dose la plus élevée est examinée à un moment d'échantillonnage particulier, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si on constate une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants et que les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson). Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (44) (45) (46) (47). Une analyse de la relation dose-réponse doit porter sur un minimum de trois groupes de traitement. Les méthodes statistiques doivent utiliser l'animal comme unité expérimentale. Des résultats positifs obtenus dans un test du micronoyau indiquent qu'un produit chimique d'essai induit la formation de micronoyaux, qui résultent de lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastés chez l'espèce utilisée dans l'essai. Si l'on cherche à détecter des centromères dans les micronoyaux, la mise en évidence de tels micronoyaux pourvus de centromères (par détection d'ADN centromérique ou de kinétochore, signes d'une perte chromosomique) révèle le caractère aneugène du produit chimique d'essai.

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

- a. aucun des groupes de traitement ne présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés par comparaison avec les témoins négatifs parallèles,

- b. un test de tendance approprié montre qu'à aucun des moments d'échantillonnage, il n'y a d'augmentation liée à la dose,
- c. l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), et
- d. il y a bien eu exposition de la moelle osseuse à la/aux produits chimiques d'essai.

Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (44) (45) (46) (47). L'exposition de la moelle osseuse à un produit chimique d'essai peut être démontrée par une baisse du ratio entre érythrocytes immatures et matures, ou par la mesure de la concentration du produit chimique dans le plasma ou le sang. Dans le cas d'une administration par intraveineuse, la preuve de l'exposition n'est pas nécessaire. Pour démontrer l'exposition de la moelle osseuse, on peut également avoir recours aux données ADME, obtenues dans le cadre d'une étude indépendante employant la même voie d'administration et la même espèce. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, le produit chimique d'essai n'induit pas de micronoyau dans les érythrocytes immatures chez l'espèce testée.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées sur les expériences déjà réalisées. Dans certains cas, il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires ou de répéter l'expérience en modifiant les conditions expérimentales.

Dans de rares cas, même après des investigations complémentaires, les données ne permettront pas de conclure que le produit chimique d'essai provoque des résultats clairement positifs ou négatifs. Les résultats de l'étude seront alors considérés comme équivoques.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Résumé

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

- justification du choix du véhicule;
- solubilité et stabilité du produit chimique dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;

- préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée et justification;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;
- méthode d'identification individuelle des animaux;
- pour les études de courte durée: poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La gamme des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions expérimentales:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);
- données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée;
- justification du choix des doses;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai;
- justification de la voie et de la durée d'administration;
- méthodes utilisées pour vérifier que le/les produits chimiques d'essai a/ont atteint la circulation générale ou le tissu cible;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;
- méthode d'euthanasie;
- méthode d'analgésie (le cas échéant);
- description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage, et justification des choix;
- méthodes de préparation des lames;
- procédures d'isolement et de conservation des échantillons;
- méthodes d'évaluation de la toxicité;
- critères d'analyse des érythrocytes immatures micronucléés;
- nombre de cellules analysées par animal pour déterminer la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés ainsi que la proportion d'érythrocytes immatures par rapport aux érythrocytes matures;
- critères d'acceptabilité de l'étude;
- méthodes utilisées pour déterminer si les micronoyaux contiennent des chromosomes entiers ou fragmentés (par exemple, recours aux anticorps anti-kinétochore ou à des sondes d'ADN centromériques), le cas échéant.

Résultats:

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;
- proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes;
- nombre d'érythrocytes immatures micronucléés, donné séparément pour chaque animal;
- moyenne \pm écart-type des érythrocytes immatures micronucléés par groupe;
- relation dose-réponse, si possible;
- analyses et méthodes statistiques employées;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs de l'essai, y compris les plages, moyennes et écarts-types;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs historiques, avec plages, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, ainsi que période couverte et nombre de points de données;
- données mettant en évidence une exposition de la moelle osseuse;
- données de caractérisation indiquant si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant;
- critères remplis pour une réponse positive ou négative.

*Discussion des résultats.**Conclusion.**Références.*

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016), "Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015". Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.
- (2) Hayashi, M. et al. (2007), In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N., Katsuma, Y., Tamura, H., Higashikuni, N. and Hayashi, M. (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells. Mutat Res, 404, 149-154.

- (8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. et al. (1990), The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.
- (14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (28) OCDE (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n° 19, OCDE, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.

- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
 - (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
 - (43) OCDE (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 198, OCDE, Paris.
 - (44) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
 - (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), "Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
 - (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.
 - (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233-241.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Centromère: régions d'un chromosome auxquelles les fibrilles du fuseau sont associées pendant la division de la cellule et qui permettent le mouvement ordonné des chromosomes-filles vers les pôles des cellules-filles.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Érythroblaste: Stade précoce du développement d'un érythrocyte, précédant immédiatement la formation de l'érythrocyte immature, et lors duquel la cellule contient encore un noyau.

Kinétochore: Structure protéique se formant au niveau du centromère des cellules eucaryotes, qui relie le chromosome à des polymères microtubulaires provenant du fuseau mitotique au cours de la mitose et de la méiose, et qui agit pendant la division cellulaire pour séparer les chromatides sœurs.

Micronoyau: Petit noyau, présent en plus du noyau principal des cellules et séparé de celui-ci, produit pendant la télophase de la mitose (méiose) par des chromosomes ou des fragments de chromosomes retardataires.

Érythrocyte normochromatique ou mature: Érythrocyte parvenu à maturité complète ayant perdu l'ARN résiduel demeurant après l'énucléation et/ou ayant perdu d'autres marqueurs cellulaires à vie courte qui disparaissent généralement après l'énucléation qui suit la division finale de l'érythroblaste.

Érythrocyte polychromatique ou immature: Érythrocyte nouvellement formé, à un stade intermédiaire de son développement, réagissant aux composants bleus et rouges des colorants classiques du sang tels que la coloration Giemsa-Wright, en raison de la présence d'ARN résiduel. De telles cellules nouvellement formées sont pratiquement identiques aux réticulocytes, observables au moyen d'une coloration vitale sous l'action de laquelle l'ARN résiduel s'agglutine pour former un réticulum. D'autres méthodes, telles que la coloration monochromatique de l'ARN à l'aide de colorants fluorescents, ou le repérage des marqueurs de surface à vie courte tels que le CD71 au moyen d'anticorps fluorescents, sont aujourd'hui utilisées pour détecter les cellules sanguines nouvellement formées. Les érythrocytes polychromatiques, les réticulocytes et les érythrocytes positifs aux marqueurs CD71 sont tous des érythrocytes immatures, correspondant à différents stades d'évolution.

Réticulocyte: Érythrocyte nouvellement formé coloré au moyen d'un colorant vital sous l'action duquel l'ARN cellulaire résiduel s'agglutine pour former un réticulum caractéristique. Réticulocytes et érythrocytes polychromatiques sont des érythrocytes à un stade de développement très proche l'un de l'autre.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

*Appendice 2***PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER LES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS LE TEST DU MICRONOYAU IN VIVO****Plan factoriel et analyse factorielle**

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires).

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux logiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA ⁽¹⁾. En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. et Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable; toutefois, ils n'obtiendront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui date des approches algorithmiques du calcul statistique développées à l'ère pré-informatique

Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.»

▼B**B.13/14. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES****1. MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 471, Essai de mutation réverse sur des bactéries (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai bactérien de mutation réverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coli* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Il sert à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de plusieurs paires de base de l'ADN (1) (2) (3). Le principe de cet essai repose sur la détection de mutations qui inversent des mutations présentes dans la souche d'essai et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries de synthétiser un acide aminé essentiel. Les bactéries révertantes sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale.

Les mutations ponctuelles sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et de nombreuses données tendent à démontrer que des mutations ponctuelles frappant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le développement de tumeurs tant chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. L'essai bactérien de mutation réverse est rapide, peu coûteux et relativement facile à effectuer. Beaucoup de souches utilisées possèdent entre autres particularités, celles de les rendre plus sensibles aux mutations: séquences d'ADN plus sensibles aux mutations au niveau des sites de réversion, augmentation de perméabilité cellulaire pour les grosses molécules, élimination des systèmes de réparation de l'ADN ou favorisation (augmentation) des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN. La spécificité des souches d'essai peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents génotoxiques. On dispose pour les essais bactériens de mutation réverse de très nombreux résultats pour une grande variété de structures et d'une méthodologie d'essai qui est bien au point et qui peut être appliquée à des substances ayant des propriétés physico-chimiques très diverses, y compris les composés volatils.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Un **essai de mutation réverse** chez *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* détecte, chez une souche dont la croissance requiert la présence d'un acide aminé (respectivement histidine ou tryptophane), des mutations qui transforment cette souche en une souche dont la croissance s'effectue indépendamment d'un rapport extérieur de cet acide aminé.

Les **mutagènes provoquant la substitution de paires de base** sont des agents qui entraînent le remplacement d'une base de l'ADN. Lors d'un essai de réversion, cette modification peut avoir lieu sur le site de la mutation initiale ou sur un autre site du génome bactérien.

Les **mutagènes décalant le cadre de lecture** sont des agents qui provoquent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de base dans l'ADN, modifiant ainsi le cadre de lecture dans l'ARN.

▼B

1.3. CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES

L'essai bactérien de mutation réverse porte sur des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifère notamment du point de vue de l'absorption, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de répartition de l'ADN. Les essais *in vitro* nécessitent généralement une activation métabolique exogène. Comme les systèmes d'activation métabolique *in vitro* ne peuvent pas reproduire parfaitement le métabolisme de cellules de mammifère *in vivo*, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance chez les mammifères.

L'essai de mutation réverse sur bactéries est couramment employé comme première étape pour la détection de l'activité génotoxique en général et des mutations ponctuelles en particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de substances chimiques qui se révèlent positives dans cet essai présentent aussi une activité mutagène dans d'autres essais. Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai. Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou à des différences de biodisponibilité. D'autre part, les facteurs qui amplifient la sensibilité de l'essai de mutation réverse sur bactéries peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.

L'essai de mutation réverse sur bactéries peut ne pas convenir pour l'évaluation de certaines classes de substances chimiques, par exemple les composés fortement bactéricides (certains antibiotiques, par exemple) et ceux dont on soupçonne (ou on sait) qu'ils interfèrent spécifiquement avec le système de réplication des cellules de mammifère (par exemple les inhibiteurs de la topoisomérase ou certains analogues de nucléosides). Dans de tels cas, des essais de mutation sur des cellules de mammifère peuvent s'avérer plus appropriés.

Bien que de nombreux composés qui donnent un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, la corrélation n'est pas parfaite. Celle-ci dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérigènes qui ne sont pas détectées par cet essai parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules bactériennes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Dans le cas de la méthode d'incorporation directe (méthode par étalement), ces suspensions sont mélangées avec la gélose de surface et déposées immédiatement sur le milieu minimal. Dans le cas de la méthode avec préincubation, le mélange de bactéries en suspension-substance testée est incubé et ensuite mélangé avec un couche de gélose de surface avant d'être étalé sur le milieu minimal. Dans les deux techniques, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des revenants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant.

Plusieurs méthodes permettant de réaliser l'essai de mutation réverse sur bactéries ont été décrites. Parmi celles qui sont communément utilisées figure la méthode par incorporation directe (1) (2) (3) (4), la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6) (7) (8), la méthode de la fluctuation (9) (10) et la méthode par suspension (11). Des méthodes modifiées pour les essais avec des gaz ou des vapeurs ont été décrites (12).

▼B

Les modes opératoires décrits se réfèrent principalement aux méthodes d'incorporation directe et de préincubation. Chacune de ces méthodes peut être utilisée avec et sans activation métabolique. L'utilisation de la méthode avec préincubation permet de détecter plus efficacement l'effet mutagène de certaines substances. Ces substances appartiennent à des classes chimiques qui comprennent les nitrosamines aliphatiques à chaînes courtes, les métaux bivalents, les aldéhydes, les colorants azoïques et les composés diazoïques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les composés allyliques et nitrés (3). Il est également admis que certaines classes de mutagènes ne sont pas toujours détectées par les méthodes conventionnelles telles que l'incorporation directe ou la préincubation. Ces substances doivent être considérées comme des cas particuliers et il est fortement recommandé d'utiliser d'autres méthodes de détection. On a pu mettre en évidence les cas particuliers suivants (ainsi que des exemples de méthodes qui pourraient servir à leur détection): colorants azoïques et composés diazoïques (3) (5) (6) (13), gaz et substances chimiques volatiles (12) (14) (15) (16), glycosides (17) (18). Tout écart par rapport au mode opératoire standard demande à être scientifiquement justifié.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Préparations**1.5.1.1. *Bactéries*

On laisse des cultures fraîches de bactéries se développer jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance (environ 10^9 cellules par ml). Des cultures en fin de phase stationnaire ne doivent pas être utilisées. Il est essentiel que les cultures utilisées pour cet essai présentent une concentration élevée de bactéries viables. La concentration peut être déterminée à partir des données historiques sur les courbes de croissance des souches bactériennes utilisées ou, lors de chaque essai, par la détermination du nombre de cellules viables à l'aide de la méthode par étalement.

La température d'incubation recommandée est de 37 °C.

Au moins cinq souches de bactéries doivent être employées. Celles-ci doivent comprendre quatre souches de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537 ou TA97a ou TA97, TA98 et TA100) pour lesquelles des comparaisons entre laboratoires ont démontré la fiabilité et la reproductibilité de la réponse. Ces souches, qui comportent des paires de bases GC sur les sites primaires de réversion, risquent toutefois de ne pas déceler certains mutagènes oxydants, des agents de réticulation et des hydrazines. Ces substances mutagènes peuvent être détectées à l'aide de souches d'*E. coli* WP2 ou de *S. typhimurium* TA102 (19) qui ont une paire de base AT sur le site primaire de réversion. Par conséquent, il est recommandé de mettre en œuvre la combinaison de souches suivante:

- *S. typhimurium* TA1535, et
- *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, et
- *S. typhimurium* TA98, et
- *S. typhimurium* TA100, et
- *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

Pour les mutagènes à pouvoir réticulant, il peut être préférable d'inclure la souche TA102 ou d'ajouter une souche d'*E. coli* pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN [*E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101), par exemple].

▼B

La préparation des cultures souches, la vérification des marqueurs et le stockage doivent s'effectuer suivant des méthodes reconnues. Pour chaque culture souche congelée, il faut démontrer que la croissance exige la présence d'un acide aminé (histidine pour *S. typhimurium* et tryptophane pour *E. coli*). D'autres caractéristiques phénotypiques demandent également à être vérifiées, à savoir la présence ou l'absence de plasmides de résistance, s'il y a lieu [résistance à l'ampicilline des souches TA98, TA100 et TA97a ou TA97, WP2 *uvrA* et WP2 *uvrA* (pKM101), et résistance à l'association ampicilline/tétracycline de la souche TA102], ainsi que la présence de mutations caractéristiques (à savoir la mutation *rfa* chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité au cristal violet et la mutation *uvrA* chez *E. coli* ou *uvrB* chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité aux UV) (2) (3). D'autre part, les souches doivent produire un nombre de colonies de révertants spontanés par boîte qui se situe dans la gamme de fréquence prévue sur la base des données historiques du laboratoire et de préférence être comparable aux valeurs citées dans la littérature.

1.5.1.2. *Milieu*

On utilise une gélose minimale appropriée (composée, par exemple, de milieu minimal E de Vogel-Bonner et de glucose) et une gélose de recouvrement contenant de l'histidine et de la biotine ou du tryptophane pour permettre quelques divisions cellulaires (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activation métabolique*

Les bactéries sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus communément utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des indicateurs enzymatiques comme Aroclor 1254 (1) (2) ou une combinaison de phénobarbital et de β -naphthoflavone (18) (20) (21). La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 5 et 30 % v/v dans le mélange S9. Le choix et la composition du système d'activation métabolique peuvent varier suivant la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser plusieurs concentrations de la fraction post-mitochondriale. Dans le cas de composés azoïques et diazoïques, un système d'activation métabolique réducteur peut s'avérer plus approprié (6) (13).

1.5.1.4. *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, plus éventuellement diluées avant le traitement des bactéries. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées au système d'essai directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des bactéries et l'activité du mélange S9 (22). L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau.

▼B1.5.2. **Conditions expérimentales**1.5.2.1. *Souches utilisées (voir point 1.5.1.1)*1.5.2.2. *Concentration d'exposition*

La cytotoxicité et la solubilité dans le mélange d'essai final sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

Un essai préliminaire destiné à déterminer la toxicité et les caractéristiques de solubilité peut être utile. La cytotoxicité peut être détectée par une réduction du nombre de révertants, un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien ou une diminution du taux de survie des cultures traitées. Les systèmes d'activation métabolique peuvent avoir une influence sur la cytotoxicité d'une substance. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation dans le mélange final est observée à l'œil nu dans les conditions réelles de l'essai.

Pour les substances d'essai solubles et non cytotoxiques, on recommande une concentration maximale de 5 mg ou 5 µl par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5 µl par boîte, l'essai doit comprendre une ou plusieurs concentrations auxquelles on observe une insolubilité. Pour les substances qui sont déjà cytotoxiques à une concentration inférieure à 5 mg ou 5 µl/boîte, l'essai doit être effectué jusqu'à une concentration cytotoxique. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

Pour un premier essai, il convient de tester au moins cinq concentrations analysables différentes de la substance d'essai, avec des intervalles d'environ une demi-unité logarithmique, c'est-à-dire $\sqrt{10}$. Pour établir une relation dose-réponse, il peut s'avérer nécessaire de réduire ces intervalles. Dans le cas de substances d'essai contenant des quantités substantielles d'impuretés potentiellement mutagènes, il peut être utile d'effectuer des essais avec des concentrations supérieures à 5 mg ou 5 µl/boîte.

1.5.2.3. *Témoins négatifs et positifs*

Des témoins positifs spécifiques de la souche, et des témoins négatifs (solvant ou véhicule), doivent être inclus dans chaque essai, avec ou sans activation métabolique. Dans le cas des témoins positifs, on utilisera une concentration permettant de démontrer l'efficacité de chaque essai.

Pour les essais avec système d'activation métabolique, le ou les témoins positifs de référence doivent être choisis en fonction du type de souche bactérienne utilisé.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs pour les essais avec activation métabolique:

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Diméthyl-9,10 anthracène	781-43-1	212-308-4
Diméthyl-7,12 benz[a]anthracène	57-97-6	200-359-5
3enzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
Amino-2 anthracène	613-13-8	210-330-9

▼B

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	

La substance suivante convient comme témoin positif pour la méthode d'activation métabolique réductrice:

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines
Rouge Congo	573-58-0	209-358-4

L' amino-2 anthracène ne peut être utilisé comme indicateur unique de l'efficacité du mélange S9. S'il est utilisé, il faut également caractériser chaque lot de S9 avec un mutagène qui requiert une activation métabolique par des enzymes microsomaux, benzo[a]pyrène et diméthylbenzanthracène par exemple.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs spécifiques de souches pour les essais sans activation métabolique exogène:

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines	Souche
Azoture de sodium	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 et TA 100
Nitro-2 fluorène	607-57-8	210-138-5	TA 98
Amino-9 acridine	90-45-9	201-995-6	TA 15 37, TA 97 et TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 et TA 97a
Hydroperoxyde de cumène	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA et TA 102
N-éthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
1-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Souches contenant des plasmides

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés comme référence. L'utilisation de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagée, s'ils sont disponibles.

L'essai doit comprendre des témoins négatifs constitués de solvant ou véhicule sans substances d'essai, auxquels sont appliquées les mêmes conditions expérimentales qu'à la substance d'essai. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

▼B**1.5.3. Mode opératoire**

Pour la méthode par étalement (1) (2) (3) (4) sans activation métabolique, on ajoute généralement 0,05 ml ou 0,1 ml de la solution à tester, 0,1 ml de culture bactérienne fraîche (contenant environ 10^8 cellules viables) et 0,5 ml de tampon stérile à 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pour l'essai avec activation métabolique, on mélange habituellement 0,5 ml du mélange d'activation métabolique contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriaie (entre 5 et 30 % v/v), les bactéries et la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On laisse la gélose de recouvrement se solidifier avant incubation.

Dans la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6), la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, est préincubée avec la souche d'essai (environ 10^8 cellules viables) et un tampon stérile ou 0,5 ml du système d'activation métabolique généralement pendant 20 minutes ou plus à 30-37 °C. On ajoute ensuite la gélose de recouvrement et on verse le tout sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On mélange généralement 0,05 ou 0,1 ml de la substance d'essai, ou d'une solution de celle-ci, 0,1 ml de bactéries et 0,5 ml de mélange S9 ou de tampon stérile avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pendant la préincubation, les tubes doivent être aérés par agitation.

Pour une bonne estimation de la variation, chaque concentration doit être testée dans trois boîtes de Petri. Le nombre de boîtes peut être limité à deux si cela se justifie scientifiquement. La perte accidentelle d'une boîte n'invalide pas nécessairement l'essai.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients hermétiquement fermés (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Incubation

Toutes les boîtes d'un essai donné doivent être incubées à 37 °C pendant 48-72 heures. À la fin de la période d'incubation, on compte dans chaque boîte le nombre de colonies révertantes.

2. RÉSULTATS**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Les données doivent être présentées sous la forme du nombre de colonies révertantes par boîte. Le nombre de colonies révertantes dans les boîtes de témoins négatifs (témoins traités avec le solvant et, le cas échéant, témoins non traités) et positifs doit également être mentionné. Le dénombrement par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et l'écart-type doivent être indiqués pour la substance d'essai ainsi que pour les témoins positifs et négatifs (non traités et/ou traités au solvant).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse nettement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation, il convient d'envisager une modification des conditions expérimentales, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses, la méthode de traitement (étalement ou préincubation en milieu liquide) et les conditions d'activation métabolique.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre de révertants ou une augmentation reproductible du nombre de colonies de revenants par boîte à une ou plusieurs concentrations pour au moins une souche, avec ou sans activation métabolique (23). En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (24) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus à l'essai de mutation réverse sur bactéries indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitution de bases ou décalage du cadre de lecture dans le génome de *Salmonella typhimurium* et/ou *Escherichia coli*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du solvant/véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Souches:

- souches utilisées,
- nombre de cellules par culture,
- caractéristiques des souches.

Conditions expérimentales:

- quantité de substance d'essai par boîte (mg/boîte ou µl/boîte) et justification du choix des doses et du nombre de boîtes par concentration,
- milieux utilisés,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- procédés de traitement.

Résultats:

- signes de toxicité,
- signes de précipitation,
- dénombrement par boîte,

▼B

- nombre moyen de colonies révertantes par boîte et écart-type,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants (étendues, moyennes et écarts-types),
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Genetox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives. *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Privai, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.

▼B

- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B**B. 17. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VITRO DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE****1. MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 476, Essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères permet de détecter des mutations géniques induites par des substances chimiques. Les lignées cellulaires appropriées comprennent des cellules de lymphome de souris L5178Y, les lignées CHO-AS52 et V79 de cellules de hamster chinois et les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (1). Dans ces lignées cellulaires, les critères génétiques les plus couramment utilisés sont une mutation sur les loci de la thymidine kinase (TK) et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), ainsi qu'un transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XPRT). Les essais de mutation TK, HPRT et XPRT détectent des gammes différentes d'effets génétiques. L'emplacement autosomique de TK et XPRT peut permettre de détecter des effets génétiques (par exemple des délétions importantes) qui ne sont pas détectés sur le locus HPRT de chromosomes X (2, 3, 4, 5, 6).

L'essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifère peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou de souches cellulaires. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture et de la stabilité de la fréquence de mutation spontanée.

Les essais in vitro requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique qui ne peut pas reproduire parfaitement les conditions présentes in vivo chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque et pouvant provenir de modifications du pH ou de l'osmolalité ou d'une forte cytotoxicité (7).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérogénicité. La corrélation dépend de la classe chimique et de plus en plus d'éléments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules de mammifères (6).

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Mutation directe: mutation génique de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique de la fonction de la protéine codée.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: substances qui entraînent le remplacement d'une ou de plusieurs bases de l'ADN.

Mutagènes décalant le cadre de lecture: substances qui entraînent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

▼B

Temps d'expression du phénotype: période pendant laquelle des produits géniques non modifiés disparaissent des cellules qui viennent de subir une mutation.

Fréquence de mutants: rapport cellules mutantes observées/cellules viables.

Croissance totale relative: augmentation du nombre de cellules dans le temps par rapport à une population témoin; elle est calculée comme le produit de la croissance en suspension par rapport au témoin négatif et de l'efficacité de clonage par rapport au témoin négatif.

Croissance relative en suspension: augmentation du nombre de cellules pendant la période d'expression par rapport au témoin négatif.

Viabilité: efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement dans des conditions sélectives après la période d'expression.

Taux de survie: efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement à la fin de la période de traitement; le taux de survie est généralement exprimé par rapport au taux de survie de la population cellulaire témoin.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les cellules déficientes en thymidine kinase (TK) par suite de la mutation directe $TK^{-/-} \rightarrow TK^{-/-}$ sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules non déficientes en TK sont sensibles à la TFT, ce qui entraîne une inhibition du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, les cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que les cellules normales, qui contiennent de la TK, ne le peuvent pas. De la même façon, des cellules déficientes en HPRT ou XPR1 sont sélectionnées par leur résistance à la thio-6 guanine (TG) ou à l'aza-8 guanine (AG). Lorsqu'un analogue d'une base ou une substance apparentée à l'agent sélectif est soumis à un essai de mutation génique sur des cellules de mammifère, il convient d'en étudier soigneusement les propriétés. Il faut, par exemple, examiner toute toxicité sélective soupçonnée de la substance d'essai vis-à-vis de cellules mutantes et non mutantes. Par conséquent, la performance du système ou de l'agent de sélection doit être confirmée lors de l'essai de substances ayant une similitude de structure avec l'agent de sélection (8).

Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées à la substance d'essai, avec et sans activation métabolique, pendant une période appropriée. Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (9, 10, 11, 12, 13). On détermine la cytotoxicité en mesurant l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative des cultures après la période de traitement. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque locus et du type de cellule choisi, afin de permettre une expression phénotypique presque optimale des mutations induites. On détermine la proportion de mutants en mettant en culture un nombre connu de cellules dans un milieu contenant l'agent sélectif pour détecter les cellules mutantes et dans un milieu exempt d'agent sélectif pour déterminer l'efficacité de clonage (viabilité). Les colonies sont comptées après une durée d'incubation appropriée. On compare le nombre de colonies mutantes en milieu sélectif au nombre de colonies en milieu non sélectif pour obtenir la proportion de mutants.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparations**1.4.1.1. *Cellules*

Divers types de cellules conviennent pour ce test, entre autres: sous-clones de L5178Y, CHO, AS52, V79 ou TK6. Les cellules utilisées doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée et une fréquence de mutation spontanée stable. On doit veiller à ce que les cellules ne soient pas contaminées par des mycoplasmes. Des cellules contaminées ne doivent pas être utilisées.

L'essai doit être conçu de façon à avoir une sensibilité et une puissance prédéterminées. Le nombre de cellules, de cultures et de concentrations de la substance d'essai utilisées doit refléter ces paramètres définis à l'avance (14). À chaque stade de l'essai, le nombre minimal de cellules viables survivant au traitement doit être basé sur la fréquence de mutation spontanée. Une règle générale consiste à utiliser un nombre de cellules au moins égal à dix fois l'inverse de cette fréquence. Cependant, il est recommandé d'utiliser au moins 10^6 cellules. Pour s'assurer de la performance constante de l'essai, il faut disposer de données antérieures adéquates relatives au système cellulaire utilisé.

1.4.1.2. *Milieux et conditions de culture*

On doit utiliser des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés (récipients de culture, température, concentration de CO_2 et humidité). Les milieux doivent être choisis en fonction des systèmes sélectifs et du type de cellules utilisés dans l'essai. Il est particulièrement important de choisir des conditions de culture qui assurent une croissance optimale des cellules pendant la période d'expression, ainsi que la capacité des cellules, tant mutantes que non mutantes, à former des colonies.

1.4.1.3. *Préparation des cultures*

Les cellules sont multipliées à partir de cultures souches, ensemencées dans le milieu de culture et incubées à 37 °C. Avant l'emploi des cultures pour l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent.

1.4.1.4. *Activation métabolique*

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, par exemple Aroclor 1254 (15, 16, 17, 18) ou un mélange de phénobarbital et de β -naphthoflavone (19, 20).

La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 10 % v/v dans le milieu final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut y avoir avantage à utiliser plus d'une concentration de la fraction post-mitochondriale.

▼B

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création de lignées cellulaires génétiquement modifiées exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par la pertinence de l'isoenzyme du cytochrome P4 50 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5. Substance d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un solvant ou un véhicule approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement ou après dilution au système d'essai. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales**1.4.2.1. Solvant/véhicule**

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée à l'aide d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2. Concentration d'exposition

La cytotoxicité, la solubilité dans le mélange d'essai final et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

La cytotoxicité doit être mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur pertinent de l'intégrité et de la croissance cellulaire, tel que l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité dans un essai préliminaire.

Il convient d'utiliser au moins quatre concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, ces concentrations doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie généralement des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et $\sqrt{10}$ au maximum. Si la concentration la plus forte est basée sur la cytotoxicité, elle devrait donner un taux de survie relatif (efficacité de clonage relative) ou une croissance totale relative d'environ 10 à 20 % (mais non inférieure à 10 %). En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes: 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

▼B

Les substances relativement insolubles doivent être testées jusqu'à des concentrations égales ou supérieures à la limite de solubilité dans les conditions de culture. L'insolubilité doit être mise en évidence dans le milieu de traitement final auquel les cellules sont exposées. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'exil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus dans chaque expérience avec et sans activation métabolique. Quand l'essai est effectué avec activation métabolique, la substance utilisée comme témoin doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

Des exemples de substances pouvant servir comme témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Locus	Substance	N° CAS	N° Eines
Absence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	TK (petites et grandes colonies)	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	Présence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5
N-Nitrosodiméthylamine			62-75-9	200-549-8
Diméthyl-7,12 benzanthracène			57-97-6	200-359-5
TK (petites et grandes colonies)		Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
		Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-Nitrosodiméthylamine (pour des niveaux élevés de S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5

D'autres substances de référence appropriées peuvent être utilisées comme témoins positifs, par exemple la 5-bromo 2'-désoxyuridine (n° CAS 59-14-3, n° Eines 200-415-9) si le laboratoire possède des contrôles historiques relatifs à cette substance. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagé, s'ils sont disponibles.

▼B

Des témoins négatifs, constitués uniquement du solvant ou du véhicule dans le milieu de traitement et traités de la même façon que la substance d'essai, doivent être inclus. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'action délétère ou mutagène.

1.4.3. Mode opératoire**1.4.3.1. Traitement avec la substance d'essai**

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (une durée de trois à six heures est généralement efficace) et peut s'étendre sur un ou plusieurs cycles cellulaires.

On peut réaliser les cultures en un seul ou en double exemplaire pour chaque concentration testée. Dans le cas des cultures en un seul exemplaire, il faut augmenter le nombre des concentrations afin d'assurer un nombre adéquat de cultures à analyser (par exemple, au moins huit concentrations analysables). Les cultures servant de témoins négatifs (solvant) sont faites en double.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (21, 22).

1.4.3.2. Détermination du taux de survie, de la viabilité et de la proportion de mutants

À la fin de la période d'exposition, les cellules sont lavées et mises en culture en vue de la détermination de leur taux de survie et de l'expression du phénotype mutant. La détermination de la cytotoxicité commence généralement après la période de traitement par la mesure de l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou de la croissance totale relative des cultures.

À chaque locus correspond un temps bien défini qui est nécessaire à l'expression presque optimale du phénotype des mutants nouvellement induits (HPRT et XPRT ont besoin d'au moins 6 à 8 jours et TK d'au moins 2 jours). Pour déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage, les cellules sont placées dans un milieu en présence et en l'absence d'agent(s) sélectif(s). On commence à mesurer la viabilité, qui permet de calculer la proportion de mutants, à la fin de la période d'expression en déposant les cultures dans un milieu non sélectif.

Si la substance d'essai est positive à l'essai sur L5178Y TK^{-/-}, la taille des colonies doit être déterminée dans au moins une des cultures traitées (à la concentration positive la plus élevée) et dans les témoins négatifs et positifs. Si la substance d'essai est négative à l'essai sur L5178Y TK^{+/-}, la taille des colonies doit être déterminée dans les témoins négatifs et positifs. Dans le cas des essais sur TK6TK^{+/-}, on peut également déterminer la taille des colonies.

▼B**2. RÉSULTATS****2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Les données doivent comprendre la détermination de la cytotoxicité et de la viabilité, le nombre de colonies et la proportion de mutants dans les cultures traitées et les cultures témoins. Dans le cas d'une réponse positive à l'essai sur L5178Y TK^{+/−}, on dénombre les colonies en distinguant les petites des grandes colonies pour au moins une concentration de la substance d'essai (concentration positive la plus élevée) et pour les témoins négatifs et positifs. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants (petites et grandes) a été étudiée en détail (23, 24). Dans l'essai TK^{+/−}, les colonies sont recensées sur la base du critère de croissance normale (grandes colonies) et de croissance faible (petites colonies) (25). Les cellules mutantes qui ont subi les altérations génétiques les plus importantes ont un temps de duplication plus long et forment donc de petites colonies. Ces altérations vont de la perte du gène entier à des aberrations chromosomiques se manifestant dans le caryotype. L'induction de petites colonies de mutants a été mise en rapport avec des substances chimiques qui engendrent des aberrations chromosomiques importantes (26). Les cellules mutantes moins affectées croissent à des vitesses semblables à celles des cellules parentales et forment de grandes colonies.

Il convient d'indiquer le taux de survie (efficacité de clonage relative) ou la croissance totale relative. La proportion de mutants doit être exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre de cellules survivantes.

Les données individuelles concernant chaque culture doivent être indiquées. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse manifestement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation effectués en cas de résultats négatifs ou équivoques, il convient d'envisager une modification des paramètres de l'étude, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses et les conditions d'activation métabolique.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant ou un accroissement reproductible de la proportion de mutants. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

▼B

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs d'un essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifère indiquent que la substance d'essai induit des mutations géniques dans les cellules de mammifère des cultures utilisées. Une relation dose-réponse positive, si elle est reproductible, est des plus significatives. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas de mutation génique dans les cellules de mammifère des cultures utilisées.

3. RAPPORT**RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du véhicule/solvant,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules:

- type et source des cellules,
- nombre de cultures,
- données concernant le cycle cellulaire,
- nombre de repiquages, le cas échéant,
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,
- absence de mycoplasme, le cas échéant.

Conditions de l'essai:

- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,
- composition du milieu, concentration de CO₂,
- concentration de la substance d'essai,
- volume de véhicule et de substance d'essai ajouté,
- température d'incubation,
- temps d'incubation,
- durée du traitement,
- densité cellulaire pendant le traitement,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- témoins positifs et négatifs,

▼B

- durée de la période d'expression,
- agents sélectifs,
- critères pour conclure que les résultats des essais sont positifs, négatifs ou équivoques,
- méthodes utilisées pour compter le nombre de cellules viables et de cellules mutantes,
- définition de colonies qui sont prises en compte pour le type et pour la taille, y compris les critères pour les «petites» et «grandes» colonies.

Résultats:

- signes de toxicité,
- signes de précipitation,
- données sur le pH et l'osmolalité pendant l'exposition à la substance d'essai, si elles ont été déterminées,
- taille des colonies si elle a été déterminée pour au moins les témoins négatifs et positifs,
- aptitude du laboratoire à déceler des mutants en petites colonies avec le système L5178Y TK^{+/+}, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs concomitants,
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes, écarts-types).
- proportion de mutants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Ranbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Mailing, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, pp. 467-48 5.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*. 4, pp. 394-403.

▼B

- (5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res*, 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res*, 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res*, 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavourmin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res*, US, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res*, 196, pp. 17-36.
- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS 52 Cells, *Mutation Res*, 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK^{-/-} — TK^{-/-} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res*, 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res*, 31, pp. 347-364.

▼B

- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y^{+/−} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutation Res*, 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res*, 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcomc, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fonta, I. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burreli, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51- 55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT¹) and Mutants of L5178Y/TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small- Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/−} — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.

▼B**B.21. TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des systèmes de culture de cellules de mammifère peuvent être utilisés pour détecter des modifications phénotypiques *in vitro* induites par des substances chimiques associées à une transformation maligne *in vivo*. Parmi les cellules les plus fréquemment utilisées figurent C3H10T^{1/2}, 3T3, SHE, rat Fisher; les tests sont fondés sur des modifications de la morphologie cellulaire, la formation des foyers ou des modifications liées à la croissance ou non dans un agar semi-solide. Il existe des systèmes moins fréquemment utilisés qui décèlent d'autres modifications physiologiques ou morphologiques dans les cellules à l'issue d'une exposition à des cancérogènes chimiques. Aucun des critères analysés dans ces tests *in vitro* n'a de relation mécanistique établie avec le cancer. Certains systèmes de tests sont capables de détecter des promoteurs de tumeur. On peut déterminer la cytotoxicité en mesurant l'effet de la substance d'essai sur les aptitudes à former une colonie (efficacité de clonage) ou sur les taux de croissance des cultures. La mesure de la cytotoxicité a pour but de déterminer si l'exposition à la substance d'essai a été toxicologiquement significative mais ne peut servir à calculer la fréquence des transformations dans toutes les épreuves, étant donné que certaines de celles-ci peuvent nécessiter une incubation prolongée et/ou un réensemencement.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI*Préparations***Cellules**

Suivant l'épreuve de transformation effectuée, diverses lignées cellulaires ou cellules primaires peuvent être utilisées. L'investigateur veillera à ce que les cellules utilisées pour l'épreuve présentent la modification phénotypique adéquate après exposition à des cancérogènes connus et à ce que la preuve de la validité et de la fiabilité de l'essai effectué dans le laboratoire de l'investigateur soient étayées par des documents.

Milieu

On utilisera des milieux et des conditions d'essai convenant à la méthode de transformation utilisée.

▼B**S u b s t a n c e d ' e s s a i**

Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans des milieux de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. La concentration finale du véhicule dans le milieu de culture n'affectera ni la viabilité des cellules, ni le taux de croissance, ni l'incidence de transformation.

A c t i v a t i o n m é t a b o l i q u e

Les cellules sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système approprié d'activation métabolique de mammifère. Si l'on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, la nature de l'activité sera reconnue comme appropriée à la classe chimique testée.

*Conditions d'essai***U t i l i s a t i o n d e t é m o i n s p o s i t i f s e t n é g a t i f s**

Des témoins positifs utilisant une substance à action directe et une substance nécessitant une activation métabolique seront inclus dans chaque expérience: un témoin négatif (véhicule) sera également utilisé.

Les substances ci-après peuvent, par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

— substances chimiques à action directe:

— méthanesulfonate d'éthyle,

— μ -propiolactone,

— substances nécessitant une activation métabolique:

— 2-acétylamino fluorène,

— 4-diméthylaminoazobenzène,

— 7,12-diméthylbenzo(a)anthracène.

Si cela se justifie, un témoin positif supplémentaire appartenant à la même classe chimique que la substance testée devrait être inclus.

C o n c e n t r a t i o n s d ' e x p o s i t i o n

Plusieurs concentrations de la substance d'essai devraient être utilisées. Ces concentrations devraient produire un effet toxique en rapport avec la concentration, la concentration maximale produira un faible taux de survie, la concentration minimale un taux de survie voisin de celui observé pour le témoin négatif. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de substances non toxiques très solubles dans l'eau, la concentration maximale devrait être déterminée cas par cas.

▼B*Conduite de l'essai*

Les cellules sont exposées pendant un laps de temps adéquat dépendant du système cellulaire utilisé, et ceci peut impliquer un nouveau traitement assorti d'un changement de milieu (et si nécessaire, un nouveau mélange d'activation métabolique) si l'exposition est prolongée. Les cellules n'ayant pas une activité métabolique intrinsèque suffisante devraient être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. À l'issue de la période d'exposition, les cellules sont lavées de manière à éliminer la substance testée et mises en culture dans des conditions permettant l'apparition du phénotype transformé étudié et l'incidence de cette transformation est déterminée. Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux et peuvent être combinés différemment suivant la méthode utilisée, par exemple comptage par boîte, boîtes positives ou nombre de cellules transformées. Le cas échéant, le taux de survie sera exprimé en pourcentage des taux témoins; la fréquence de transformation correspondra au nombre de cellules transformées par nombre de survivantes. Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. RAPPORT**3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- type de cellule utilisée, nombre de cultures cellulaires, méthodes d'entretien des cultures cellulaires,
- conditions d'essai: concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, temps d'incubation, durée et fréquence du traitement, densité cellulaire durant le traitement, type de système d'activation métabolique exogène utilisé, témoins positifs et négatifs, spécification du phénotype étudié, système sélectif utilisé (le cas échéant), justification du choix des doses,
- méthode utilisée pour compter les cellules viables et transformées,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

▼B**B.22. TEST DE LÉTALITÉ DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La létalité dominante provoque la mort de l'embryon ou du fœtus. L'induction de létalité dominante par exposition à une substance chimique indique que la substance a altéré le tissu germinale de l'espèce étudiée. Il est généralement admis que la létalité dominante est imputable à une lésion chromosomique (anomalies structurelles et numériques). Si les animaux traités sont des femelles, la mort de l'embryon peut également être due à des effets toxiques.

En général, les mâles sont exposés à la substance d'essai et accouplés avec des femelles vierges non traitées. Les différents stades des cellules germinales peuvent être testés séparément grâce à l'utilisation de périodes d'accouplement séquentielles. L'accroissement du nombre d'implants morts par femelle dans le groupe traité par rapport au nombre d'implants morts par femelle dans le groupe témoin reflète les pertes après implantation. Les pertes avant implantation peuvent être estimées par comptage des corps jaunes ou en comparant le nombre total d'implants par femelle dans le groupe traité et dans le groupe témoin. L'effet total de létalité dominante est égal à la somme des pertes avant et après implantation. Le calcul de l'effet total de la létalité dominante est basé sur la comparaison entre le nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe testé et celui enregistré pour le groupe témoin. Une réduction du nombre des implants à certaines périodes peut être due à la destruction de cellules (c'est-à-dire de spermatoocytes et/ou de spermatogonies).

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI*Préparations*

Lorsque c'est possible, les substances d'essai sont dissoutes ou mises en suspension dans une solution saline isotonique. Les substances chimiques insolubles dans l'eau peuvent être dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Le véhicule utilisé ne devrait pas interférer avec la substance d'essai et ne devrait pas produire d'effets toxiques. Des préparations fraîchement réalisées de la substance d'essai sont utilisées.

▼B*Conditions d'essai*

Voie d'administration

La substance d'essai ne devrait être généralement administrée qu'une seule fois. En fonction des informations toxicologiques disponibles, un programme de traitement répété peut être utilisé. Les voies d'administration habituelles sont l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Il est recommandé d'utiliser des rats ou des souris. De jeunes animaux ayant atteint leur pleine maturité sexuelle sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins.

Nombre et sexe

Un nombre adéquat de mâles traités est utilisé compte tenu de la variabilité spontanée du caractère biologique étudié. Le nombre retenu devrait être fondé sur la sensibilité de détection et le degré de signification qui ont été prédéterminés. Par exemple, dans une expérience type, le nombre de mâles retenus pour chaque groupe de dose devrait être suffisant pour obtenir environ 30 à 50 femelles gravides par période d'accouplement.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Généralement des témoins positifs et négatifs (véhicule) seront inclus simultanément dans chaque expérience. Si des expériences récentes effectuées dans le même laboratoire ont donné des résultats acceptables pour des témoins positifs, ces résultats peuvent être utilisés à la place d'un témoin positif simultané. En ce qui concerne les substances témoins positives, on utilisera une dose faible appropriée (par exemple MMS, i.p., 10 mg/kg), afin de démontrer la sensibilité du test.

Doses

Normalement trois niveaux de dose sont utilisés. La dose élevée produira des signes de toxicité ou réduira la fécondité des animaux traités. Dans certains cas, un seul niveau de dose élevé peut suffire.

Épreuve limite

Les substances non toxiques sont testées à raison de 5 g/kg en cas d'administration unique et de 1 g/kg/jour en cas d'administration multiple.

Conduite de l'essai

Plusieurs schémas de traitement sont possibles. La méthode la plus fréquente est celle de l'administration unique. D'autres schémas de traitement peuvent être utilisés.

Chaque mâle est accouplé séquentiellement à 1 ou 2 femelles vierges non traitées à des intervalles de temps appropriés après le traitement. Les femelles devraient être laissées avec les mâles pendant au moins un cycle œstral complet ou jusqu'à ce que l'accouplement soit constaté par la présence de sperme dans le vagin ou la présence d'un bouchon vaginal.

▼B

Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinates traitées soient impliqués.

Les femelles sont sacrifiées durant la seconde moitié de leur gestation et le contenu de leur utérus est examiné, afin de déterminer le nombre d'implants vivants et morts. Les ovaires peuvent être examinés afin de déterminer le nombre de corps jaunes.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux indiquant le nombre de mâles, le nombre de femelles gravides ainsi que le nombre de femelles non gravides. Les résultats de chaque accouplement, y compris l'identité de chaque mâle et de chaque femelle, sont présentés séparément. Pour chaque femelle, la semaine d'accouplement et la dose reçue par les mâles ainsi que les fréquences d'implants vivants et morts sont rapportés.

Le calcul de l'effet total de la létalité dominante est basé sur une comparaison du nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe testé avec le nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe témoin. Le rapport entre implants vivants et implants morts dans le groupe traité comparé avec le rapport correspondant dans le groupe témoin est analysé en vue d'indiquer la perte après implantation.

Si les résultats sont enregistrés sous la forme de mortalité précoce et de mortalité tardive, les tableaux devraient faire clairement ressortir cette différence. Si la perte avant implantation est évaluée, il y a lieu d'en présenter les résultats. Cette perte peut être exprimée par la différence entre le nombre de corps jaunes et le nombre d'implants ou par la réduction du nombre moyen d'implants par femelle par rapport aux accouplements témoins.

Les résultats sont évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèces, souche, âge et poids des animaux utilisés, nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,
- substance d'essai, véhicule, niveaux de dose testés et justification du choix des doses, témoins négatifs et positifs, données relatives à la toxicité,
- voie et programme de traitement,
- programme d'accouplement,
- méthode utilisée pour constater l'accouplement,
- moment du sacrifice,
- critères de comptage des effets de la létalité dominante,
- relation dose-réponse, si possible,

▼B

- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B**B.23. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRE****1. MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 483, Essai d'aberration chromosomique sur des spermatogonies de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai *in vivo* d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifère est destiné à détecter les substances qui causent des aberrations de structure dans les spermatogonies de mammifère (1, 2, 3, 4, 5). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des mutations chromatidiennes, mais des aberrations chromosomiques se produisent également. Cet essai n'est pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et n'est pas utilisé systématiquement dans ce but. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques humaines.

Cet essai évalue des atteintes chromosomiques qui surviennent dans les spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'introduction de mutations transmissibles à la descendance dans les cellules germinales.

Pour cet essai, on utilise généralement des rongeurs. Cet essai cytogénétique *in vivo* détecte des aberrations chromosomiques dans les spermatogonies en mitose. D'autres cellules cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Afin de détecter des aberrations chromatidiennes dans les spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations ne disparaissent lors des divisions cellulaires ultérieures. L'analyse de chromosomes méiotiques peut fournir des informations complémentaires utiles; elle est destinée à mettre en évidence des aberrations de type chromosomique aux stades de la diacinèse-métaphase I, lorsque les cellules traitées se transforment en spermatocytes.

Cet essai *in vivo* est conçu pour vérifier si les mutagènes actifs sur les cellules somatiques le sont également sur les cellules germinales. L'essai sur spermatogonies se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, puisqu'il permet de tenir compte de facteurs de métabolisme *in vivo*, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN.

Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies présentant des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées représentent une réponse globale des populations de spermatogonies traitées, dans lesquelles les cellules différenciées, plus nombreuses, prédominent. En fonction de leur position dans le testicule, les différentes générations de spermatogonies sont ou non exposées aux substances présentes dans la circulation générale en raison de la barrière physique et physiologique des cellules de Sertoli et de la barrière sang-testicule.

L'utilisation de cet essai ne convient pas s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Aberration de type chromatidien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Lacune: une lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre: une modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polyploïdie: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire $3n$, $4n$, etc.)

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple la colchicine ou Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. *Sélection des espèces animales*

On utilise communément des hamsters chinois et des souris. Des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés. Il convient d'utiliser des animaux adultes jeunes et sains, issus de souches de laboratoire courantes. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne doit pas excéder ± 20 % du poids moyen.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. *Préparation des animaux*

De jeunes mâles sains sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

▼B1.4.1.4. *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent accompagner chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure in vivo dans les spermatogonies lorsqu'ils sont administrés à des niveaux d'exposition supposés produire un accroissement détectable par rapport au bruit de fond.

Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	N° CAS	N° Eines
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide monomère	79-06-1	201-173-7
Triéthylènemélamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

▼B

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre d'animaux**

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comporter au moins cinq mâles analysables.

1.5.2. **Modalités de traitement**

La substance d'essai est de préférence administrée en une seule fois ou en deux fois (c'est-à-dire en un seul ou deux traitements). Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modalités de traitement doivent être scientifiquement justifiées.

Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, deux prélèvements d'échantillons sont effectués après le traitement. La cinétique cellulaire pouvant être influencée par la substance d'essai, le premier et le deuxième prélèvement ont lieu respectivement environ 24 heures et 48 heures après le traitement. Pour les autres doses, le prélèvement est effectué après 24 heures ou 1,5 cycle cellulaire après le traitement, à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement plus propice à la détection des effets (6).

D'autres temps de prélèvement peuvent être employés. Par exemple, dans le cas de substances chimiques qui pourraient induire des chromosomes retardataires ou d'avoir des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (1).

La pertinence d'un traitement répété doit être évaluée au cas par cas. Après un traitement répété, les animaux doivent être sacrifiés 24 heures (1,5 cycle cellulaire) après le dernier traitement. De plus, d'autres temps de prélèvements peuvent être employés si nécessaire.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un agent bloquant la métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Ce délai est d'environ 3-5 heures pour la souris et de 4-5 heures environ pour le hamster chinois.

1.5.3. **Niveaux de dose**

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et les mêmes modalités de traitement que ceux de l'étude principale (7). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de dose doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant la même modalité de traitement, seraient létales.

▼B

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les spermatogonies (par exemple une diminution des mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique; cette diminution ne devrait pas dépasser 50 %).

1.5.4. Test limite

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans le test limite.

1.5.5. Voies d'administration

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. Préparation des chromosomes

Des suspensions cellulaires obtenues à partir d'un ou des deux testicules immédiatement après le sacrifice sont exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules sont ensuite étalées sur des lames et colorées.

1.5.7. Analyse

Au moins 100 cellules en métaphase bien étalées sont analysées par animal (soit un minimum de 500 métaphases par groupe d'essai). Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoquant souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte de chromosomes, les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. RÉSULTATS**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure et le nombre d'aberrations par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

▼B

Pour les cellules en méiose, il conviendra de prendre comme élément de cytotoxicité le rapport du nombre de spermatogonies en métaphase de première mitose/nombre de spermatogonies en métaphase de seconde mitose. Cette analyse sera réalisée à la fois chez les animaux traités et les contrôles négatifs sur un échantillon de 100 cellules en division pour chaque animal. Dans le cas où seules des mitoses sont observées, l'index mitotique doit être déterminé dans au moins 1 000 cellules de chaque animal.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul moment de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (8) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai *in vivo* d'aberration chromosomique sur spermatogonies indiquent que la substance induit des aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites n'atteignent pas le tissu cible devrait être discuté.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre et âge des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

▼B

Conditions expérimentales:

- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- justification du choix de la voie d'administration,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix des moments de sacrifice,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,
- description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau mitotique et durée du traitement,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

- signes de toxicité,
- index mitotique,
- taux de mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique,
- type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,
- nombre total d'aberrations par groupe,
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données sur les témoins négatifs concomitants,
- données sur les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- données sur les témoins positifs concomitants,
- changements de la ploïdie, le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

▼B

4.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*. 3, pp. 289-294.
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52. pp. 207-209.
- (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
- (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report. Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B**B.25. TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'épreuve de translocation héréditaire chez la souris décèle des changements chromosomiques structurels et numériques dans les cellules germinales de mammifères tels qu'ils sont mis en évidence dans la descendance de première génération. Les types de changements chromosomiques détectés sont des translocations réciproques et, si la descendance femelle est incluse, la perte du chromosome X. Les porteurs de translocations et les femelles XO présentent une fertilité réduite permettant la sélection d'une descendance F_1 en vue d'une analyse cytogénétique. Une stérilité totale est due à certains types de translocations (autosome X et type c-t). Les translocations sont observées cytogénétiquement dans les cellules méiotiques en diacynèse-métaphase I des individus mâles, qu'il s'agisse de mâles F_1 ou de fils de femelles F_1 . Les femelles XO sont identifiées cytogénétiquement par la présence de 39 chromosomes seulement dans des mitoses de la moelle osseuse.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI*Préparations*

Les substances d'essai sont dissoutes dans une solution saline isotonique. Si elles sont insolubles dans l'eau, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. On utilise des solutions fraîchement préparées de la substance d'essai. Si un véhicule est utilisé pour faciliter le traitement, il ne doit pas interférer avec la substance d'essai et ne pas produire d'effets toxiques.

Voie d'administration

Les voies d'administration sont habituellement l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Pour faciliter l'élevage et la vérification cytologique, ces expériences sont effectuées avec des souris. Aucune souche spécifique de souris n'est requise. Toutefois, la taille moyenne d'une portée de la souche utilisée devra être supérieure à 8 et être relativement constante.

Des animaux sains ayant atteint leur maturité sexuelle seront utilisés.

▼B**Nombre d'animaux**

Le nombre d'animaux nécessaires dépend de la fréquence de translocations spontanées ainsi que du taux minimal d'induction requis pour un résultat positif.

L'essai consiste habituellement en une analyse de la descendance mâle F_1 . Au moins 500 descendants mâles F_1 sont testés par groupe de dose. Si la descendance femelle F_1 est incluse, 300 mâles et 300 femelles sont nécessaires.

Contrôles

Des résultats de contrôles adéquats provenant d'épreuves réalisées simultanément et de contrôles historiques doivent exister. S'il existe des résultats acceptables de contrôles positifs provenant d'expériences récemment effectuées dans le même laboratoire, ces résultats peuvent être utilisés à la place de contrôles positifs simultanés.

Doses

Une dose est testée, il s'agit habituellement de la dose maximale associée à la production d'effets toxiques minimaux mais n'affectant pas le comportement reproducteur ou la survie. Pour établir une relation dose/réponse, deux autres doses plus faibles sont nécessaires. Dans le cas de substances non toxiques, on devrait avoir recours à une exposition à la dose maximale possible.

*Conduite de l'essai***Traitement et accouplement**

Deux programmes de traitement existent. L'administration unique de la substance d'essai est la méthode la plus fréquente. La substance d'essai peut également être administrée 7 jours sur 7 pendant 35 jours. Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinales traitées soient impliqués. À l'issue de la période d'accouplement, les femelles sont placées dans des cages individuelles. Lorsqu'elles ont mis bas, la date, la taille de la portée et le sexe des jeunes sont enregistrés. Toute la descendance mâle est sevrée et toute la descendance femelle est écartée à moins d'être incluse dans l'expérience.

Recherche des hétérozygotes de translocation

On utilise une des deux méthodes disponibles:

- analyse de la fécondité de la descendance F_1 et vérification ultérieure d'éventuels porteurs de translocations par analyse cytogénétique,
- analyse cytogénétique de tous les mâles F_1 sans sélection préalable par vérification de la fécondité.

a) Analyse de la fécondité:

La fécondité réduite d'un individu F_1 peut être déterminée en observant la taille de la portée et/ou en analysant le contenu utérin des partenaires femelles.

Il y a lieu de fixer les critères de détermination de la fécondité normale et réduite de la souche de souris utilisée.

▼B

Observation de la taille de la portée: Les mâles F_1 à tester sont placés dans des cages individuelles avec des femelles provenant soit de la même expérience soit de la colonie. Les cages sont inspectées quotidiennement à partir du dix-huitième jour qui suit l'accouplement. La taille de la portée et le sexe de la descendance F_2 sont enregistrés au moment de la naissance et les jeunes sont ensuite éliminés. Si la descendance femelle F_1 est testée, les descendants F_2 provenant de petites portées sont conservés en vue d'une analyse plus approfondie. Les femelles porteuses de translocation font l'objet d'une vérification par analyse cytogénétique d'une translocation dans n'importe lequel de leurs descendants mâles. Les femelles XO sont identifiées par la modification du rapport des sexes dans leur descendance, rapport qui passe de 1:1 à 1:2 mâles/femelles. Dans une méthode séquentielle, les animaux F_1 normaux ne font pas l'objet d'une autre vérification si la première portée F_2 atteint ou dépasse une valeur normale prédéterminée, sinon une deuxième ou une troisième portée F_2 sont observées. Les animaux F_1 qui ne peuvent pas être classés comme normaux après observation de jusqu'à trois portées F_2 maximum sont soit soumis à un nouveau contrôle par le biais d'une analyse du contenu utérin de leurs partenaires femelles soit directement soumis à une analyse cytogénétique.

Analyse du contenu utérin: La réduction de la taille des portées chez les porteurs de translocation est due à la mort des embryons, de sorte qu'un grand nombre d'implants morts indique la présence d'une translocation chez l'animal soumis au test. Chaque mâle F_1 à tester est accouplé à 2 ou 3 femelles. On constate la conception en examinant les femelles tous les matins afin de déceler la présence de bouchons vaginaux. Les femelles sont sacrifiées 14 à 16 jours plus tard et le nombre d'implants vivants et morts présents dans leur utérus est enregistré.

b) Analyse cytogénétique:

Les préparations de testicules sont effectuées par la méthode de séchage à l'air. Les porteurs de translocations sont identifiés par la présence de configurations multivalentes en diacinèse métaphase I dans les spermatocytes primaires. L'observation d'au moins 2 cellules présentant une association multivalente constitue la preuve nécessaire que l'animal testé est porteur d'une translocation.

Si aucune sélection par analyse de fécondité n'a été effectuée, tous les mâles F_1 sont soumis à un examen cytogénétique. Un minimum de 25 diacinèses métaphases I par mâle doivent être analysées au microscope. L'examen des métaphases mitotiques, des spermatogonies ou de la moelle osseuse est requise pour les mâles F_1 ayant de petits testicules et présentant un arrêt méiotique avant diacinèse ou pour les femelles F_1 suspectées d'être XO. La présence inhabituelle d'un chromosome long et/ou court dans 10 cellules est la preuve d'une translocation particulière entraînant la stérilité du mâle (type c-t). Quelques translocations X autosomes provoquant la stérilité du mâle peuvent uniquement être identifiées par une analyse des bandes de chromosomes mitotiques. La présence de 39 chromosomes dans 10 mitoses sur 10 est la preuve d'un état XO chez une femelle.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux.

La taille moyenne des portées et le rapport entre les sexes sont enregistrés à la naissance et au sevrage pour chaque période d'accouplement.

▼B

Lors de l'évaluation de la fécondité des animaux de F_1 , la taille moyenne des portées issues de tous les accouplements normaux ainsi que la taille individuelle des portées issues d'animaux F_1 porteurs de translocation sont présentées. En ce qui concerne l'analyse du contenu utérin, le nombre moyen d'implants vivants et morts issus d'accouplements normaux et le nombre d'implants vivants et morts pour chaque accouplement de porteurs de translocation F_1 sont notés.

Lors de l'analyse cytogénétique de la diacinèse-métaphase I, le nombre des différents types de configurations multivalentes et le nombre total de cellules sont relevés pour chaque porteur de translocation.

Pour les individus stériles F_1 , le nombre total d'accouplements et la durée de la période d'accouplement sont indiqués. Le poids des testicules et les détails de l'analyse cytogénétique sont indiqués.

Pour les femelles XO, on indique la taille moyenne de la portée, le rapport entre les sexes dans la descendance F_2 ainsi que les résultats de l'analyse cytogénétique.

Si d'éventuels porteurs de translocation F_1 sont présélectionnés par des tests de fécondité, les tableaux mentionneront combien parmi eux ont été confirmés comme étant des hétérozygotes de translocation.

Les données relatives aux témoins négatifs ainsi que les expériences témoins positives sont présentées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- souche de souris, âge des animaux, poids des animaux traités,
- nombre d'animaux parents de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,
- conditions d'essai, description détaillée du traitement, doses, solvants, programme d'accouplement,
- nombre et sexe des jeunes par femelle, nombre et sexe des jeunes élevés en vue d'une analyse de translocation,
- moment et critères de l'analyse de translocation,
- nombre et description détaillée des porteurs de translocation, y compris données relatives à l'élevage et au contenu utérin, si possible,
- méthodes cytogénétiques et détails de l'analyse microscopique, de préférence avec clichés,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

▼B

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B**B.26. ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE
TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — RONGEURS:
90 JOURS****1. MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 408 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition répétée durant une période prolongée, période qui s'étend du sevrage jusqu'à l'état adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode accorde davantage d'importance aux effets neurologiques et donne des indications relatives aux effets sur le système immunitaire et sur la reproduction. Elle insiste également sur la nécessité d'observer très attentivement les animaux sur le plan clinique, en vue d'obtenir le plus d'informations possible. Cette étude devrait permettre de repérer les produits chimiques susceptibles d'avoir une action neurotoxique ou des effets sur le système immunitaire ou les organes reproducteurs, pouvant justifier des études plus approfondies.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

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

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

DSET: abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level}, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'un niveau de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés: au terme de l'essai, les animaux suivants sont également sacrifiés et autopsiés.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux en bonne santé, ayant été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et qui n'ont pas encore été sujets d'expériences. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et les groupes témoins. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. Un numéro d'identification unique est attribué à chaque animal.

1.4.2. **Préparation des doses**

La substance d'essai est administrée par gavage ou dans les aliments ou dans l'eau de boisson. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une suspension ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu 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 les conditions d'administration doit être déterminée.

1.4.3. **Conditions d'essai**1.4.3.1. *Animaux d'expérience*

L'espèce préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs, notamment la souris, puissent être utilisées. 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 en aucun cas au-delà de l'âge de 9 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 de chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

1.4.3.2. *Nombre et sexe*

Au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur un produit de structure très proche, on pourra envisager 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, une fois la période de traitement terminée, la persistance ou la réversibilité de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement devrait être fixée en fonction des effets observés.

▼B1.4.3.3. *Niveaux de dose*

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.4.3.4). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées ou d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance ou à ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) 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 séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations toxicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas: effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.3.4. *Essai limite*

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé 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 est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5. **MODE OPÉRATOIRE**1.5.1. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le 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. Sauf pour les 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.

▼B

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 pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. 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 sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.2. Observations

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Deux fois par jour au minimum, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Ils doivent être soigneusement consignés, de préférence en utilisant un système de notation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes relevés devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréments ainsi que l'activité autonome (sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (1).

À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

Vers la fin de la période d'exposition, mais en aucun cas avant la onzième semaine, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (1) (auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (2) (3) (4), et évaluer la force de préhension (5) et l'activité motrice (6). Des détails supplémentaires sur les méthodes utilisables figurent dans les références respectives. Des méthodes non décrites dans les références peuvent aussi être appliquées.

Les observations fonctionnelles préconisées vers la fin de l'étude ne sont pas indispensables si on dispose d'observations fonctionnelles provenant d'autres études et que les examens cliniques quotidiens n'ont pas révélé de troubles fonctionnels.

▼B

Exceptionnellement, 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.

1.5.2.1. *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture 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. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

1.5.2.2. *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des prélèvements sont réalisés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

On procédera aux examens hématologiques suivants au terme de la période d'essai et sur les prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant: hémocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des leucocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps de coagulation.

Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur chaque animal juste avant son sacrifice ou au cours de celui-ci (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai). A l'instar des examens hématologiques, les analyses de biochimie clinique peuvent être conduites sur des échantillons de sang prélevés en cours d'essai. Il est recommandé de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang⁽¹⁾. Les analyses effectuées sur le plasma ou le sérum devraient comprendre le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, l'azote uréique du sang, la créatinine, les concentrations totales de protéines et d'albumine et plus de deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyl transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Des mesures d'activités enzymatiques supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, peuvent également être incluses.

Les analyses d'urine suivantes peuvent être réalisées, à titre facultatif, au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés: apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

Il faut envisager par ailleurs de rechercher les indicateurs sériques de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter des courbes métaboliques connexes, d'autres analyses devraient être pratiquées, notamment celles du calcium, du phosphore, des triglycérides à jeun, d'hormones spécifiques, de la méthémoglobine et de la cholinestérase. Ces analyses doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

⁽¹⁾ Pour un certain nombre de paramètres mesurés dans le sérum ou le plasma, et particulièrement pour le glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang, et ce essentiellement afin d'éviter l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement de la prise de nourriture et qui aurait tendance à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation difficile. Cependant, le jeûne des animaux durant une nuit entière peut influencer sur leur métabolisme général et risque, notamment dans les études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on a choisi de faire jeûner les animaux toute la nuit, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles de l'étude.

▼B

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

Si les données historiques sont insuffisantes, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres d'hématologie et de biochimie clinique avant de commencer l'étude; il est généralement déconseillé d'obtenir ces données avant le traitement (7).

1.5.2.3. *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif 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 épидидymes, l'utérus, les ovaires, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux: cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons (traités par gonflement avec un fixateur, puis immergés), l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, la vésicule biliaire (souris), les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatique ou poplitée interne) de préférence proche du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou ponction de moelle osseuse examinée directement), la peau et les yeux (si des changements ont été relevés au cours des examens ophtalmologiques). Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.2.4. *Histopathologie*

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. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

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.

▼B**2. RÉSULTATS ET RAPPORT****2.1. RÉSULTATS**

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats 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 du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité et une description des symptômes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques doivent être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser doit intervenir au stade de rédaction du protocole d'étude.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. 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.

2.2.2. Animaux d'expérience

- Espèce et souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux.
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3. Conditions d'essai

- Justification du choix des doses,
- détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, 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,
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4. Résultats

- Poids corporel et variation de poids corporel,
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité,

▼B

- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),
- résultats de l'examen ophtalmologique,
- évaluations de l'activité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice (le cas échéant),
- paramètres hématologiques et valeurs normales de référence,
- paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence,
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- données relatives à l'absorption, le cas échéant,
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.
- (2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999-1003.
- (3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691-704.
- (4) Moser, V. C, Mc Daniel, 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*, 10S, pp. 267-283.
- (5) 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, pp. 233-236.
- (6) 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, pp. 599-609.
- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», *Fundam. & Appl. Toxicol*, 29, pp. 198-201.

▼B**B.27. ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE
TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES NON-RONGEURS:
90 JOURS****1. MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 409 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition réitérée durant une période de croissance rapide jusqu'au début de l'âge adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode d'essai permet de mettre en évidence les effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques chez des non-rongeurs; elle ne doit être utilisée que dans les cas suivants:

- lorsque les effets observés dans d'autres études font ressortir la nécessité d'éclaircir et de préciser certains points chez une deuxième espèce non-rongeurs, ou
- lorsque les études toxicocinétiques montrent que l'utilisation d'une espèce particulière de non-rongeur constitue le choix le plus pertinent en tant qu'animal d'expérience, ou
- lorsque d'autres raisons précises justifient l'utilisation d'une espèce de non-rongeur.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

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

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

DSET: abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level), c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement afin de déceler d'éventuels symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Sélection de l'espèce animale**

L'espèce non-rongeur couramment utilisée est le chien, dont la race doit être définie; on se sert fréquemment du beagle. D'autres espèces, par exemple le porc ou le porc nain (mini porc), peuvent aussi être utilisées. Les primates ne sont pas recommandés et leur utilisation doit être justifiée. Il convient d'employer de jeunes animaux en bonne santé et, dans le cas du chien, l'administration de la substance à tester devrait commencer de préférence à l'âge de 4-6 mois, et jamais au delà de 9 mois. Lorsque l'étude est préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser la même espèce et la même race dans les deux études.

1.4.2. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser de jeunes animaux, en bonne santé, acclimatés aux conditions du laboratoire et n'ayant pas encore été sujets d'expérience. La durée de l'acclimatation dépendra de l'espèce d'essai sélectionnée et de sa provenance. Il est recommandé de compter au moins 5 jours pour les chiens ou les porcs élevés à cette fin dans une animalerie résidente et au moins deux semaines pour ces mêmes animaux s'ils proviennent de sources extérieures. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. Un numéro d'identification distinct doit être attribué à chaque animal.

1.4.3. **Préparation des doses**

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou dans l'eau de boisson, par gavage ou dans des capsules. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physicochimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu 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 les conditions d'administration doit être déterminée.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Il faut employer au moins 8 animaux (4 femelles et 4 mâles) à chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. Le nombre d'animaux survivants au terme de l'étude doit être suffisant pour permettre une évaluation significative des effets toxiques. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur une substance de structure très proche, on envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 8 animaux (4 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la concentration la plus élevée, en vue d'observer, une fois la période de traitement écoulée, la réversibilité ou la persistance de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement doit être fixée en fonction des effets observés.

▼B**1.5.2. Dosage**

Il faut utiliser au minimum 3 doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.5.3). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai ou par ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) 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 séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations lexicales du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité, et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5.3. Essai limite

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé 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 est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5.4. Administration des doses

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple 5 jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume devrait normalement être le plus petit possible. Sauf pour les 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.

▼B

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 pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage ou dans une capsule, la dose doit être administrée aux mêmes heures chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.5. Observations

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Au moins deux fois par jour, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués, si possible, hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes de toxicité doivent être soigneusement notés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité. Les observations devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréments ainsi que l'activité autonome (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres.

À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décele des changements liés au traitement dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

1.5.5.1. Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture 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. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

▼B1.5.5.2. *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des échantillons sont prélevés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

Au début de l'essai et, par la suite, soit tous les mois, soit à partir du milieu de la période d'essai et à la fin de celle-ci, il y a lieu d'effectuer un examen hématologique en mesurant l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, la numération des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire, la numération des plaquettes et l'étude de paramètres de la coagulation tels que le temps de coagulation, le temps de prothrombine ou le temps de thromboplastine.

Des analyses de biochimie clinique destinées à l'étude des principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux, au début de l'essai et ensuite soit tous les mois, soit au milieu et à la fin de l'essai. Les paramètres qui doivent être analysés comprennent l'équilibre électrolytique, le métabolisme des glucides et les fonctions hépatiques et rénales. Le choix de certaines analyses dépendra des observations sur le mode d'action de la substance d'essai. Les animaux doivent être mis à jeun durant une période dépendant de l'espèce la prise de sang. Les analyses proposées comprennent le calcium, le phosphore, le chlore, le sodium, le potassium, le glucose à jeun, l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, l'ornithine décarboxylase, la gamma glutamyle transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine sanguine et les concentrations totales de bilirubine et de protéines sériques.

Les analyses d'urine doivent être pratiquées au moins au début, au milieu et en fin d'essai, sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés. Les paramètres à relever sont l'apparence, le volume, l'osmolalité ou la densité, le pH, les protéines, le glucose, le sang et les cellules sanguines. Des paramètres supplémentaires peuvent être étudiés, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés.

Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher des indicateurs de lésions générales des tissus. D'autres déterminations pourraient être nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate: l'analyse des lipides, des hormones, de l'équilibre acido-basique, de la méthémoglobine et de l'inhibition de la cholinestérase. Des analyses de biochimie clinique supplémentaires peuvent être pratiquées, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés. Celles-ci doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

1.5.5.3. *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie et la vésicule biliaire, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, les ovaires, l'utérus, la thyroïde (et les glandes parathyroïdes) le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

▼B

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux: cervical, médiathoracique et lombaire), l'hypophyse, les yeux, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons, l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatiques ou tibiaux), de préférence proches du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou une ponction de moelle osseuse examinée directement) et la peau. Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des organes cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.5.4. *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au moins au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

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.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. **RÉSULTATS**

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats 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 du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité et une description des signes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affectés par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser devrait intervenir au stade de la rédaction du protocole d'étude.

2.2. **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

▼B**2.2.1. Substance d'essai**

- État physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données permettant l'identification chimique,
- véhicule (le cas échéant), justification du choix si autre que l'eau.

2.2.2. Animaux d'expérience

- Espèce et souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3. Conditions d'essai

- Justification du choix des doses,
- détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, 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,
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4. Résultats

- Poids corporel et variation de poids corporel,
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité,
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),
- résultats de l'examen ophtalmologique,
- paramètres hématologiques et valeurs normales de référence,
- paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence,
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- données relatives à l'absorption, le cas échéant,
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

▼B**B.28. TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS****1. MÉTHODE****1.1 INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B.

1.2 DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3 SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4 PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les doses croissantes de la substance d'essai sont appliquées quotidiennement, sur la peau des animaux de plusieurs lots d'expérience, à raison d'une dose par lot durant une période de 90 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience de même que ceux encore en vie à l'issue de celle-ci sont autopsiés.

1.5 CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**1.6.1 Préparations**

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Peu de temps avant l'essai, on tond la fourrure de la région dorsale des animaux. On peut avoir recours au rasage, mais l'opération doit alors être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est habituellement nécessaire de répéter ces opérations toutes les semaines environ et il faut prendre grand soin d'éviter toute lésion de la peau pendant ces opérations. La surface à dégager pour l'application de la substance à tester ne sera pas inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal sera pris en compte pour décider de la zone à dégager et des dimensions de la surface à traiter. Lorsque l'essai porte sur des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement testées sans dilution préalable. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2 Conditions expérimentales**1.6.2.1 Animaux d'expérience**

Le rat, le lapin ou le cochon d'Inde adultes peuvent être utilisés; d'autres espèces aussi, mais il faut alors en justifier l'emploi. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux ne dépassera pas ± 20 % de la valeur moyenne. Si une étude dermique subchronique constitue la phase préparatoire d'une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

▼B**1.6.2.2. Nombre et sexe**

20 animaux au moins (10 femelles et 10 mâles) à la peau saine seront utilisés pour chaque niveau de dose. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter à ce nombre celui des animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être traité avec la dose la plus élevée pendant 90 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 28 jours qui suivent le traitement.

1.6.2.3. Doses

On utilisera au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule. La période d'exposition sera d'au moins six heures par jour. La substance à tester sera appliquée chaque jour à la même heure et sa quantité fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire ou bi-hebdomadaire afin de conserver une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal. À l'exception de l'application de la substance à tester, les animaux du lot témoin seront traités de la même façon que les sujets des lots traités. Si un véhicule est utilisé pour faciliter l'application, il sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions que pour les lots traités et la dose reçue correspondra à celle du lot traité par la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit être déterminée de manière à produire des effets toxiques mais pas, ou rarement, la mort de l'animal; la dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Si l'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la dose la plus faible dépassera cette valeur. L'idéal serait que la dose intermédiaire produise l'effet toxique minimal observable. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, l'écart entre les doses sera calculé de manière à entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots correspondant aux doses faible et intermédiaire ainsi que chez les témoins, le nombre de décès sera faible, afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Si l'application de la substance à tester provoque une grave irritation cutanée, les concentrations seront réduites; ceci peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. Si les lésions cutanées sont très graves, il peut s'avérer nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.3. Essai de limite

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg ou avec une dose plus élevée en fonction de la possibilité d'une exposition humaine — pour autant que celle-ci soit connue — n'a provoqué aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.4. Période d'observation

Les animaux d'expérience feront l'objet d'observations quotidiennes afin de déceler les manifestations de toxicité. Le moment de la mort ainsi que le moment auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront notés.

▼B**1.6.5. Mode opératoire**

Les animaux seront placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7 pendant une période de 90 jours.

Les animaux de tous les groupes satellites devant faire l'objet d'observations complémentaires seront gardés en vie pendant 28 jours encore, sans traitement, afin de constater la guérison ou la persistance des effets toxiques. La durée d'exposition sera de 6 heures par jour.

La substance d'essai sera appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être moins importante mais la couche doit être aussi mince et aussi uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'un carré de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée sera, en outre, convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer ladite substance. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer tout résidu de substance avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux seront observés quotidiennement et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront enregistrés. Pendant la période d'encagement, on observera notamment les modifications du poil et de la peau, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. La consommation alimentaire et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin d'éviter toute perte par cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots traités non satellites seront autopsiés. Les animaux moribonds seront immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens ci-après sont habituellement effectués pour tous les animaux, y compris ceux du lot témoin:

- a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant d'administrer la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence pour tous les animaux mais au moins pour le lot traité par la dose la plus élevée ainsi que pour le lot témoin. Si des modifications oculaires sont observées tous les animaux seront examinés.
- b) Un examen hématologique comprenant l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation par des épreuves telles que temps de coagulation, temps de Quick, temps de thromboplastine ou numération des plaquettes sanguines sera effectué au terme de l'expérience.

▼B

- c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées à l'issue de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions hépatique et rénale présentent un intérêt général pour toutes les études. Le choix d'épreuves spécifiques sera influencé par les observations relatives au mode d'action de la substance. Il est suggéré de doser les substances suivantes: le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose à jeun (la période de jeûne étant adaptée à l'espèce), les transaminases glutamo-pyruvique ⁽¹⁾ et glutamo-oxaloacétique ⁽²⁾, l'ornithine-décarboxylase, la gamma-glutamyl transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine plasmatique, la bilirubine totale et les protéines sériques totales. Les autres analyses éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique. D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.
- d) Un examen régulier des urines n'est pas nécessaire; un tel examen n'est indiqué qu'en cas de toxicité probable ou manifeste.

Si les informations recueillies dans le passé ne sont pas appropriées, les paramètres hématologiques et biochimiques cliniques seront déterminés avant le commencement de l'expérience.

1.6.6. **Autopsie**

Tous les animaux seront soumis à une autopsie complète comprenant l'examen 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 et les testicules seront pesés, à l'état humide, le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié dans l'éventualité d'examen histopathologiques ultérieurs: toute lésion macroscopique, encéphale — y compris section de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, (trachée), poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, organes génitaux annexes, vésicule biliaire (si présente), œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie urinaire, ganglion lymphatique représentatif, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, (yeux), (sternum avec moelle osseuse), (fémur — y compris surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiathoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne seront examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

1.6.7. **Examen histopathologique**

- a) La peau normale et la peau traitée ainsi que les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et du lot exposé à la dose la plus élevée doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

▼B

- c) Les organes-cibles des animaux appartenant aux autres lots traités seront examinés.
- d) Si l'on utilise des rats, les poumons des animaux appartenant aux lots exposés aux doses faible et intermédiaire seront soumis à un examen histopathologique afin de détecter tout signe d'infection qui permette de juger facilement de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques systématiques peuvent ne pas être nécessaires pour les animaux de ces lots mais doivent toujours être effectués pour les organes présentant des lésions dans le groupe traité par la dose la plus élevée.
- e) Lorsqu'un lot satellite est utilisé, un examen histopathologique sera pratiqué sur les tissus et organes présentant des signes de toxicité dans les lots traités.

2. RÉSULTATS

Les résultats seront résumés sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de lésions, le type de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RAPPORT**3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales,
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- dose dépourvue d'effet, si possible,
- réponse toxique par sexe et par dose,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie au terme de l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout symptôme et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- observations ophtalmologiques,
- examens hématologiques pratiqués et résultats,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats (y compris, résultats de l'examen des urines),
- résultats d'autopsie,

▼B

- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼ M4**B.29. TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS****RÉSUMÉ**

La présente méthode d'essai B.29 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation d'une substance d'essai à la suite d'une exposition subchronique (90 jours), et de fournir des données fiables en vue d'estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs (10 mâles et 10 femelles) sont exposés 6 heures par jour pendant une période de 90 jours (13 semaines) a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (étude de réversibilité), des sacrifices en cours d'essai, des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 413 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). Le texte original de la ligne directrice 413 sur la toxicité subchronique par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.29 [équivalente à la ligne directrice 413 révisée (2009)] a été mise à jour pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences réglementaires actuelles et futures.
2. Les études de toxicité subchronique par inhalation sont principalement utilisées pour calculer des concentrations réglementaires en vue d'évaluer les risques pour les travailleurs en milieu professionnel. Elles servent aussi à estimer les risques liés à l'exposition humaine dans les lieux d'habitation, les transports et l'environnement. La présente méthode d'essai permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 90 jours (approximativement 10 % de la durée de vie d'un rat). Les données dérivées des études de toxicité subchronique par inhalation peuvent être utilisées pour procéder à des estimations quantitatives des risques et pour choisir les concentrations dans les études de toxicité chronique. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai (2).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance à tester afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues d'autres études sur l'exposition répétée. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.

▼ **M4**

4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré. Le document d'orientation n° 39 (2) fournit de plus amples informations. Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.
5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Sélection des espèces animales**

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

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

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement être mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendre qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

▼ **M4****Chambre d'inhalation**

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie dans les études de toxicité subchronique par inhalation. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au «pire des cas», 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatils (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite doit permettre d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations est généralement nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée par le choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.
12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Selon les effets à mesurer retenus, trois à six mâles et trois à six femelles sont exposés à chaque niveau de concentration. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 28 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

▼ M4

13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérisation érythro, les hormones thyroïdiennes (T_3 , T_4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subchronique comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 18). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs mâles et 10 rongeurs femelles exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines (soit une durée totale de l'étude d'au moins 90 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition «corps entier» de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.
15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:
- le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,
 - le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) est (sont) espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,
 - le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Sacrifices en cours d'essai

16. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux en cours d'essai, il faut accroître le nombre d'animaux exposés à chaque niveau de concentration du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. Le recours aux sacrifices en cours d'essai est justifié, et les analyses statistiques en tiennent dûment compte.

▼ M4**Étude satellite (étude de réversibilité)**

17. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de dix mâles et de dix femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin parallèle (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 18).

Animaux témoins

18. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et est utilisé comme véhicule témoin.

CONDITIONS D'EXPOSITION**Administration des concentrations**

19. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, des concentrations choisies, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les matières particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

20. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm , avec un écart type géométrique (σ) compris entre 1,5 et 3,0 (4). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques auront une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres peuvent avoir une taille supérieure.

▼ M4**Préparation de la substance d'essai dans un véhicule**

21. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulière voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION**Débit d'air dans la chambre d'exposition**

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

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

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

Substance d'essai: concentration nominale

24. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

25. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant

▼M4

plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.

26. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
27. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptable. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).
28. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substance d'essai propulsés à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principal principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour la préparation totale et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

29. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.

▼ M4

30. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.
31. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

32. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition «corps entier» ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.
33. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.
34. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

35. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 4 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION DE NOURRITURE ET D'EAU

36. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

▼ **M4**

PATHOLOGIE CLINIQUE

37. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).
38. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle
Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransférase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlorure
Globuline	
Analyse d'urine (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	

(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant la nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).

▼ **M4**

39. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative des paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

EXAMEN OPHTHALMOLOGIQUE

40. À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un dispositif équivalent, un examen ophtalmologique du fond d'œil, des milieux de réfraction, de l'iris et de la conjonctivite est effectué avant l'administration de la substance d'essai pour tous les animaux, et au terme de l'étude pour tous les groupes témoins et groupes exposés à la concentration élevée. Si des changements dans les yeux sont décelés, tous les animaux des autres groupes sont examinés, y compris le groupe satellite (étude de réversibilité).

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

41. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
42. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épидидymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

▼ **M4**

Tableau 2

Organes et tissus à conserver lors de l'autopsie macroscopique

Aorte	Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)
[Bulbe olfactif]	Muscle (cuisse)
Cæcum	Nerf périphérique (sciatique ou tibial, de préférence proche du muscle)
Capsules surrénales	Œsophage
Cerveau (y compris segments d'hémisphères, cervelet et bulbe rachidien/pont)	Ovaires
Cœur	Pancréas
Côlon	Parathyroïdes
Dents	Peau
Duodénum	Poumons (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)
[Épididymes]	Prostate
Fémur avec articulation	Rate
Foie	Rectum
Ganglions lymphatiques (distaux par rapport au site d'entrée)	Reins
Ganglions lymphatiques depuis la région hilare du poumon, en particulier pour les substances particulières peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Sternum
[Glandes de Harder]	Testicules
[Glandes lacrymales (extraorbitales)]	Thymus
Estomac	Thyroïde
Glande mammaire (femelles)	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit nasopharyngien et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
Glandes salivaires	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Hypophyse	[Uretère]
Iléon	[Urètre]
Jéjunum	Utérus
[Langue]	Vésicule biliaire (si présente)
Larynx (3 niveaux, dont la base de l'épiglotte)	Vésicules séminales
Moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	Vessie
	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
	Organes cibles
	Toutes les masses et lésions macroscopiques

▼ **M4**

43. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).
44. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit nasopharyngien (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

45. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes surviennent dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Données**

46. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et qualitatifs, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.

▼ M4

- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles correspondent à des animaux soumis à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.
- Nombre, âge et sexe des animaux.
- Méthode de randomisation.
- Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).
- Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

- Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.
- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.
- Source d'air et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.
- Différence de pression (positive ou négative).
- Orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»).
- Stabilité de l'atmosphère d'essai.
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.
- Traitement de l'air fourni/évacué.
- Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»).
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).
- Nombre de changements de volume par heure.
- Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

- Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.

▼ M4

- Concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).
- Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.
- Toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).
- Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

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

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g .
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).

▼M4

- Tableau du poids de chacun des animaux.
- Tableau de la consommation de nourriture.
- Tableau des résultats de pathologie clinique.
- Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.
- La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).
- Le ou les organes cibles sont identifiés.
- La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1981). Toxicité subchronique par inhalation, Ligne directrice n° 413 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (4) Whalan E. and Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.

▼ M4

- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hamelers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼ M4

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ **M4****B.30. ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 452 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). La ligne directrice 452 initiale avait été adoptée en 1981. La révision de cette méthode B.30 a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4). La mise à jour de la méthode d'essai B.30 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.33 (Études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels.

2. La plupart des études de toxicité chronique étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5) pourront aussi être appliqués, moyennant des modifications appropriées, comme indiqué dans le document d'orientation de l'OCDE n° 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (6).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai, et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (6).

4. La présente méthode d'essai porte essentiellement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique. Bien que des études de toxicité chronique à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou l'inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (6) (7) et par voie cutanée (6). Les chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (7) doivent en particulier être consultés lors de la conception d'études à plus long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (10) doit être consulté dans le cas d'un essai par voie cutanée.

▼M4

5. L'étude de toxicité chronique donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée sur une portion considérable de la durée de vie des espèces employées. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, et indiquera les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé, qui permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possible.
6. Les objectifs des études couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

- identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,
- identification des organes cibles,
- caractérisation de la relation dose-effet,
- identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),
- prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,
- obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (6).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Lors de l'évaluation des caractéristiques toxicologiques d'une substance chimique d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel de toxicité chronique, et faire le moins possible appel aux animaux. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats d'éventuelles études de toxicité *in vitro* ou *in vivo*; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données Q(SAR) disponibles et les données toxicologiques relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour les essais de toxicité chronique entrepris dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai particulière (11) (12) (13) (14).
8. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (6) ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (15).

▼ M4

9. Lors de la réalisation d'une étude de toxicité chronique, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (16). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: *«Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.»*
10. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (6) ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (17) (18). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des objectifs principaux de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de dose appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 11).
11. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe), plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (la présente méthode d'essai B.30) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Toutefois, les principes déterminant le choix de la dose (paragraphe 9 et 20-25) sont respectés rigoureusement lors de la réalisation d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe); il est reconnu également que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.
12. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent dans le document d'orientation n° 116 (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 33). Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois sont justifiées, surtout dans le cas de durées plus courtes. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peut aussi être appropriée. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être enrôlés (voir paragraphe 19). Au cours de la période d'administration, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

▼ M4

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

14. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique chez les rongeurs (voir paragraphe 2), bien que certains régimes réglementaires puissent exiger la réalisation d'études similaires chez des non-rongeurs. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique avec des non-rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient être conformes aux principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi qu'au chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (6).

15. La présente méthode d'essai se rapporte essentiellement au rat, mais d'autres espèces de rongeurs, comme la souris, peuvent être utilisées. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur courte durée de vie, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs, et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de toxicité chronique sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

16. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (19) (20) (21). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire, avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée dans le cadre de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

17. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours, et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale, et n'excède pas \pm 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de

▼ M4

manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micro-puce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE**Nombre et sexe des animaux**

18. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour qu'à la fin de l'étude, chaque groupe contienne un nombre de sujets permettant d'effectuer une évaluation statistique et biologique complète. Pour les rongeurs, il convient normalement d'employer au moins 20 animaux de chaque sexe à chaque niveau de dose, tandis que pour les non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe de dose pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis.

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

19. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude (au moins 10 animaux de chaque sexe par groupe), par exemple à 6 mois, afin de recueillir des données sur la progression des changements toxicologiques et des informations mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Des groupes satellites peuvent également être constitués, afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance chimique étudiée. En général, ces investigations portent uniquement sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (22). Si des sacrifices en cours d'étude ou l'inclusion de groupes sentinelles ou satellites sont prévus, le nombre d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Ces animaux sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunosensibilité.

Groupes de dose et dosage

20. Le document d'orientation n° 116 (6), donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 27). Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

▼ M4

21. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs présentés au paragraphe 22 ci-dessous, le niveau de dose le plus élevé est choisi pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %).

22. Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité; par exemple une dose entraînant un effet indésirable préoccupant, mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible. La dose maximale ne dépasse pas 1 000 mg/kg de poids corporel (dose limite, voir paragraphe 27).

23. Les niveaux de dose et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.

24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais 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 (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation fait l'objet d'une justification.

25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (6), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:
 - non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,
 - toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre des doses externes et internes surviennent ou non,
 - lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,
 - aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,
 - régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,
 - prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

▼ M4

26. Le groupe témoin est un groupe non-traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance d'essai est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.
27. S'il est possible d'anticiper, en se basant sur les résultats d'études préliminaires, qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg poids corporel/jour, réalisé en suivant les procédures décrites pour la présente étude, ne produira probablement pas d'effets indésirables, et si la toxicité est improbable compte tenu des données disponibles sur les substances chimiques structurellement apparentées, on peut considérer qu'une étude complète à trois niveaux de dose n'est pas indispensable. Une limite de 1 000 mg/kg poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

28. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (6). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité, ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.
29. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer d'informations sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).
30. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼ M4

31. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de sept jours par semaine), et ce normalement pendant une période de 12 mois (voir également le paragraphe 33) encore qu'une durée plus longue puisse être requise selon les prescriptions réglementaires. Tout autre régime de dosage, par exemple une administration cinq jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le précise le chapitre B.9 de la présente annexe (10), et ce pendant une période de 12 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir également le chapitre B.8 de la présente annexe (8).

32. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose quotidienne en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et ne dépasse pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (22). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permet d'éviter tout effet local sévère. Il convient d'éviter les concentrations d'essai susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

33. Bien que la présente méthode d'essai concerne principalement des essais de toxicité chronique d'une durée de 12 mois, le plan de l'étude permet une application de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition. Le document d'orientation n° 116 (6) fournit des indications supplémentaires, notamment en ce qui concerne la survie des animaux d'expérience.

OBSERVATIONS

34. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.

▼ M4

35. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs, et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, 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 et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (24).
36. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou de tout autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traités à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres données suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.
37. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (24) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (25) (26) (27), et une évaluation de la force de préhension (28) ainsi que de l'activité motrice (29) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.
38. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité nutritionnelle

39. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

▼ **M4****Hématologie et biochimie clinique**

40. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois), en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 18). Dans les études faisant intervenir des non- rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.

41. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent également être indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

42. Des analyses de biochimie clinique visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques, et en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (31) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'- nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (31). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.

▼ M4

43. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (30): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.
44. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il convient de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (30). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 50), il convient d'envisager d'en obtenir

Pathologie*Autopsie macroscopique*

45. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 19). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur d'étude.
46. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 45. Les glandes surrénales, le cerveau, les épидидymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation. Dans les études chez la souris, la pesée des glandes surrénales est facultative.
47. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (32) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	muscle squelettique	rein
aorte	glande coagulante	nerf périphérique	[sternum]
[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule
cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	œil (dont rétine)	thymus
cerveau (y compris segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage	thyroïde
cœur	glande salivaire	ovaire	trachée

▼ M4

col utérin	glande surrénale	pancréas	[uretère]
côlon	hypophyse	parathyroïde	[urètre]
[dents]	iléon	peau	utérus (col inclus)
duodénum	jéjunum	poumon	vagin
épididyme	[langue]	prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)
estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	rate	vésicule séminale
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Pour les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus de l'appareil respiratoire spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

48. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (32). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,

— tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

▼ **M4****RÉSULTATS ET RAPPORT****Résultats**

49. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, 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 du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.
50. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et porter sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.
51. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 8). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données d'identification,
- provenance de la substance d'essai,
- numéro de lot,
- certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix de véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix opéré,
- nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

▼ M4

- provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification de la voie d'administration et du choix des doses,
- le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,
- données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal):

- données sur la survie,
- poids corporel/variations du poids corporel,
- prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,
- réponse toxique par sexe et dose, y compris signes de toxicité,
- nature, incidence (et, si elle est évaluée, sévérité), et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes),
- examen ophtalmologique,
- examens hématologiques,
- épreuves de biochimie clinique,
- examens d'urine,
- résultats des recherches de neurotoxicité ou d'immunotoxicité,
- poids corporel à l'issue de l'essai,
- poids des organes (et leur rapport au poids corporel, le cas échéant),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement,
- données relatives à l'absorption, le cas échéant.

▼ **M4***Traitement statistique des résultats, le cas échéant**Discussion des résultats, notamment:*

- relations dose-réponse,
- examen de toutes les informations concernant le mode d'action,
- examen de toutes les approches de modélisation,
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),
- données de contrôle historiques,
- applicabilité des résultats à l'être humain.

*Conclusions**BIBLIOGRAPHIE:*

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal- based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.
- (4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437-445.
- (5) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique, Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.
- (6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 et 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).
- (7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (8) Chapitre B.8 de la présente annexe, Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (9) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (10) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité cutanée à doses répétées – étude sur 28 jours.
- (11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.
- (12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *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.
- (13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼ **M4**

- (14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 - 837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (27) 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.
- (28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (29) 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.

▼ **M4**

- (30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ **M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B**B.31. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ POUR LE DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL****1. MÉTHODE**

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai n° 414 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour le développement est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une exposition prénatale sur la femelle gravide et sur l'organisme en développement qu'elle porte en elle; cela recouvre notamment l'évaluation des effets sur la mère, ainsi que la mortalité fœtale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus. Les déficits fonctionnels, qui représentent pourtant un aspect important du développement, ne sont pas étudiés dans le cadre de la présente méthode d'essai. Ces déficits peuvent être étudiés séparément ou en complément à la présente méthode dans le cadre de la méthode d'essai relative à la neurotoxicité pour le développement. Cette dernière méthode ainsi que la méthode relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations indiquent comment dépister les déficits fonctionnels et d'autres effets postnataux.

Il est possible que la présente méthode d'essai nécessite certaines adaptations dans des cas particuliers, compte tenu, par exemple, des propriétés physico-chimiques ou toxicologiques spécifiques de la substance d'essai. Ces adaptations sont acceptables lorsque des données scientifiques convaincantes donnent à penser qu'elles rendront l'essai plus informant. Le cas échéant, ces données scientifiques devront être soigneusement consignées dans le rapport d'essai.

1.2 DÉFINITIONS

Toxicologie du développement: l'étude des effets nocifs sur un organisme en développement, qui peuvent résulter d'une exposition antérieure à la conception, contemporaine au développement prénatal ou postnatale, jusqu'à la maturation sexuelle. La toxicité pour le développement se manifeste principalement par 1) la mort de l'organisme; 2) une anomalie structurelle; 3) une altération de croissance; 4) un déficit fonctionnel. Autrefois, la toxicologie du développement était souvent dénommée «tératologie».

Effet nocif: toute altération liée au traitement par rapport à une situation de référence, qui diminue la capacité d'un organisme à survivre, se reproduire ou s'adapter à l'environnement. La toxicologie du développement, prise dans son sens le plus large, inclut tous les effets qui interfèrent avec le développement normal du produit de conception, avant et après la naissance.

Altération de croissance: une altération qui touche les organes ou le poids corporel ou la taille de la progéniture.

Altérations (anomalies): altérations structurelles du développement qui comprennent les malformations et les variations (28).

Malformation/Anomalie majeure: changement structurel considéré comme préjudiciable à l'animal (peut aussi être létal) et généralement rare.

▼B

Variation/Anomalie mineure: changement structurel considéré comme peu ou pas préjudiciable à pour l'animal; peut être transitoire et peut survenir fréquemment dans la population témoin.

Produit de conception: l'ensemble des produits de la fécondation d'un œuf, à n'importe quel stade du développement entre la fécondation et la naissance, comprenant les membranes extra-embryonnaires et l'embryon ou le fœtus.

Implantation (nidation): la fixation du blastocyste à la muqueuse épithéliale de l'utérus, y compris la pénétration du blastocyste dans l'épithélium utérin et la nidation dans l'endomètre.

Embryon: le premier stade de développement d'un organisme, plus précisément la phase de développement d'un œuf fécondé qui commence après l'apparition du grand axe et s'achève quand toutes les structures principales sont présentes.

Embryotoxicité: nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un embryon.

Fœtus: produit de conception, durant la période post-embryonnaire.

Fœtotoxicité: nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un fœtus.

Avortement: expulsion prématurée hors de l'utérus des produits de conception: embryon ou fœtus non viable.

Résorption: phénomène par lequel un produit de conception qui meurt après l'implantation se résorbe ou a été résorbé.

Résorption précoce: trace d'implantation non accompagnée d'un embryon ou d'un fœtus reconnaissable.

Résorption tardive: embryon ou fœtus mort qui présente des changements dégénératifs externes.

DSET: dose sans effet toxique (correspond à la NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Aucune

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Normalement, la substance d'essai est administrée aux femelles gravides, au moins à partir de la nidation et jusqu'à la veille du sacrifice, lequel devrait être programmé à une date aussi proche que possible du jour probable de mise bas, sans être trop tardif pour éviter la perte de données en cas de mise bas prématurée. La méthode d'essai ne porte pas uniquement sur la période de l'organogénèse (comprise, par exemple entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jour chez les rongeurs et entre le 6^{ème} et le 18^{ème} jour chez le lapin), mais étudie aussi les effets survenus tout au long de la gestation, depuis le stade pré-implantatoire, selon les besoins, jusqu'à la veille de la césarienne. Les femelles sont sacrifiées peu avant la césarienne, le contenu utérin est examiné et les fœtus étudiés pour détecter les anomalies externes visibles ainsi que les modifications des tissus mous et du squelette.

▼B

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Choix de l'espèce animale**

Il est recommandé de pratiquer l'essai sur l'espèce la plus appropriée et d'employer les espèces et les souches de laboratoire couramment utilisées dans les essais de toxicité prénatale pour le développement. L'espèce de rongeur préféré est le rat et l'espèce non-rongeur préféré est le lapin. Le cas échéant, l'emploi d'une autre espèce doit être justifié.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

L'animalerie doit être à 22 °C ($\pm 3^\circ$) pour les rongeurs et à 18 °C ($\pm 3^\circ$) pour les lapins, avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 % sauf durant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. 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.

L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Bien qu'il soit préférable de placer les animaux s'étant accouplés dans des cages individuelles, l'encagement par petits groupes est aussi acceptable.

1.5.3. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Les animaux de tous les groupes d'essai devraient, dans toute la mesure du possible, être du même âge et du même poids. On emploiera de jeunes femelles adultes et nullipares pour chaque dose. On accouplera les femelles avec des mâles de la même espèce et de la même souche, sans accoupler les membres d'une même fratrie. Dans le cas des rongeurs, le jour 0 de la gestation est celui où l'on observe un bouchon vaginal et/ou la présence de sperme; s'agissant des lapins, le jour 0 est ordinairement celui du coït ou de l'insémination artificielle si cette technique est utilisée. Les femelles accouplées seront réparties au hasard entre groupes traités et groupes témoins. On installera les cages de façon à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur emplacement. Chaque animal sera désigné par un numéro d'identification propre. En cas d'accouplement par lots, les animaux d'un même lot seront répartis uniformément entre les groupes. De la même façon, les femelles inséminées par un même mâle seront réparties uniformément entre les groupes.

1.6. MODE OPÉRATOIRE

1.6.1. **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre de femelles suffisant pour qu'une autopsie puisse être pratiquée sur environ 20 femelles présentant un point d'implantation. Des groupes comptant moins de 16 femelles présentant un point d'implantation risquent d'être inadéquats. La mortalité maternelle n'invalide pas nécessairement l'étude, tant qu'elle demeure inférieure à 10 pour cent environ.

▼B**1.6.2 Préparation des doses**

Si on emploie un véhicule ou un autre additif pour faciliter l'administration des doses, il convient d'être attentif aux effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la rétention ou l'excrétion de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, lesquels sont susceptibles de modifier sa toxicité ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit pas être toxique pour le développement ni influencer sur la reproduction.

1.6.3 Dosage

Normalement, la substance d'essai est administrée quotidiennement depuis la nidation (par exemple 5 jours après l'accouplement) jusqu'à la veille du jour où la césarienne est prévue. Si des études préliminaires, le cas échéant, ne font pas état d'un risque élevé de pertes pré-implantatoires, il est possible d'administrer le traitement pendant toute la durée de la gestation, depuis l'accouplement jusqu'à la veille de la césarienne. Nul n'ignore que le stress ou des erreurs de manipulation pendant la gestation peuvent engendrer des pertes prénatales. Afin de prévenir des pertes fœtales non liées au traitement, on évitera de manipuler inutilement les femelles gravides ou de les soumettre à des facteurs de stress externes comme le bruit.

On utilise au moins trois doses différentes et un groupe témoin en parallèle. Des animaux sains sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins. Les doses doivent être espacées de façon à produire une gradation des effets toxiques. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée devrait avoir une certaine toxicité pour le développement et/ou la mère (signes cliniques ou diminution du poids corporel), sans entraîner la mort ni provoquer des souffrances importantes. Au moins une dose intermédiaire devrait donner lieu à la plus faible manifestation observable de toxicité. La dose la plus faible ne devrait produire aucun signe de toxicité pour la mère ou pour le développement. Il convient de choisir une série décroissante doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une concentration maximale sans effet nocif observé (DSET). L'écart optimal entre les doses d'une série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Bien que le but soit d'établir une DSET maternelle, les études qui n'aboutissent pas à la détermination de cette valeur sont également acceptables (1).

Les doses doivent être choisies en tenant compte de toutes les données de toxicité disponibles ainsi que des informations complémentaires sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. Ces informations seront aussi utiles pour justifier l'échelle des doses.

On incorporera un groupe témoin en parallèle. La substance d'essai n'est pas administrée à ce groupe qui n'est traité que par le véhicule, le cas échéant. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule. Les animaux du ou des groupes témoins seront manipulés de la même façon que les animaux du groupe d'essai. Les groupes témoins auxquels on administre le véhicule doivent recevoir la plus grande quantité utilisée de ce dernier (celle que reçoit le groupe traité à la dose la plus faible).

▼B**1.6.4 Essai limite**

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, administrée par voie orale, selon la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne aucune toxicité apparente chez les femelles gravides ou dans leur progéniture, et qu'aucun effet n'est escompté au vu des données disponibles (concernant, par exemple, des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues) il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur trois doses différentes. Suivant le niveau d'exposition humaine prévu, il peut être nécessaire d'appliquer une dose orale plus élevée dans l'essai limite. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physicochimiques de la substance d'essai qui définissent et limitent le niveau maximal d'exposition pouvant être atteint (par exemple, l'application cutanée ne doit faire apparaître aucune toxicité locale grave).

1.6.5 Administration des doses

La substance d'essai ou le véhicule sont habituellement administrés oralement par intubation. Si l'expérimentateur opte pour un autre mode d'administration, il devra motiver sa décision et justifier son choix, et procéder aux modifications nécessaires (2) (3) (4). La substance d'essai doit être administrée à peu près à la même heure chaque jour.

Normalement, on calcule la dose destinée à chaque animal d'après la pesée la plus récente de ce dernier. Il convient toutefois d'être prudent lorsqu'on adapte la dose au cours du dernier tiers de la gestation. On s'appuiera sur les données existantes pour sélectionner la dose de façon à prévenir un excès de toxicité pour la mère. Néanmoins, si on constate une toxicité excessive chez les mères traitées, il faudra les euthanasier. Si plusieurs femelles gravides manifestent des signes de toxicité excessive, on envisagera de sacrifier le groupe traité à cette dose. Si on recourt au gavage, il faudrait de préférence administrer la substance en une seule fois à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une seule fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Lorsqu'on utilise de l'huile de maïs comme véhicule, le volume ne devrait pas excéder 0,4 ml/100 g de poids corporel. 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.

1.6.6 Observation des mères

Les observations cliniques sont effectuées et notées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en tenant compte de la période durant laquelle on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale. On consignera l'état des animaux, notamment, les animaux morts ou moribonds, les changements comportementaux pertinents et tous les signes de toxicité apparents.

1.6.7 Poids corporel et consommation de nourriture

Les animaux sont pesés au jour 0 de gestation ou au plus tard au jour 3 si des animaux déjà accouplés sont fournis par un éleveur extérieur, puis au premier jour de traitement et au moins tous les trois jours durant la période d'administration et enfin le jour du sacrifice.

▼B

Le relevé de la consommation d'aliments doit être effectué tous les trois jours et coïncider avec les jours de pesée des animaux.

1.6.8 Autopsie

On sacrifiera les femelles un jour avant la date prévue de mise bas. Les femelles qui présentent des signes d'avortement ou de mise bas prématurée avant la date prévue du sacrifice doivent être sacrifiées et faire l'objet d'un examen macroscopique complet.

Juste après le sacrifice ou la mort en cours de l'étude, les mères sont soumises à un examen macroscopique destiné à mettre en évidence d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. Pour demeurer objectif, il est préférable que l'expérimentateur ignore la dose administrée au groupe lors de l'observation des mères au cours de la césarienne et de l'examen subséquent des fœtus.

1.6.9 Examen du contenu utérin

Il y a lieu d'enlever l'utérus juste après le sacrifice ou dès que possible après la mort pour s'assurer de l'état de gravidité des femelles. On examinera aussi les utérus apparemment non gravides (par exemple, par coloration au sulfure d'ammonium chez les rongeurs et par la coloration de Salewski ou par une méthode équivalente appropriée chez les lapins) pour confirmer la non-gravidité (5).

Les utérus gravides sont pesés, col inclus. Les poids des utérus gravides de femelles mortes en cours d'essai ne sont pas déterminés.

On compte le nombre de corps jaunes chez les femelles gravides.

Le contenu utérin est examiné afin de relever le nombre d'embryons ou de fœtus morts et le nombre de fœtus viables. Il est nécessaire de décrire le degré de résorption pour évaluer la date approximative de la mort du produit de conception (voir paragraphe 1.2).

1.6.10 Examen des fœtus

Il convient de déterminer le sexe et le poids corporel de chaque fœtus.

On recherche la présence d'altérations externes sur chaque fœtus.

On examine les fœtus pour voir s'ils présentent des altérations du squelette ou des tissus mous (par exemple des variations et des malformations ou des anomalies) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). La catégorisation des altérations fœtales est préférable, mais facultative. Si on procède à une catégorisation, il faut stipuler clairement les critères qui définissent chaque catégorie. On vérifiera avec une attention particulière si le développement du tractus génital n'a pas été altéré.

Pour les rongeurs, on prépare environ la moitié de chaque portée en vue de l'examen des altérations squelettiques. Le restant sera préparé en vue de l'examen des altérations des tissus mous, lequel sera conduit au moyen de coupes sériées réalisées suivant des méthodes reconnues ou appropriées ou de techniques soignées de dissection macroscopique.

▼B

S'agissant des non-rongeurs, par exemple les lapins, les éventuelles altérations des tissus mous et du squelette doivent être recherchées sur tous les fœtus. On examine les corps de ces fœtus en les disséquant soigneusement pour repérer des altérations des tissus mous; cette opération peut faire appel à une technique permettant d'effectuer un examen plus approfondi de la structure cardiaque interne (25). Les têtes de la moitié des fœtus examinés de cette manière doivent être prélevées et préparées en vue de l'évaluation des altérations des tissus mous (notamment les yeux, le cerveau, les conduits nasaux et la langue), selon des techniques classiques de coupes sériées (26) ou une méthode ayant la même sensibilité. Les corps de ces fœtus et ceux des fœtus intacts restants sont préparés puis examinés pour établir s'ils présentent des altérations squelettiques, à l'aide des mêmes méthodes que pour les rongeurs.

2. RÉSULTATS**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Les résultats sont consignés séparément pour chaque femelle et sa progéniture, 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 morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de chaque mort ou euthanasie, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant 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'observations pratiquées sur les embryons ou fœtus et toutes les données pertinentes sur la portée.

On évaluera les résultats numériques par une méthode statistique appropriée, en prenant la portée comme unité pour l'analyse des résultats. Il convient d'utiliser une méthode statistique reconnue; le choix de la méthode doit intervenir au stade de la conception de l'étude et doit être justifié. Les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date programmée du sacrifice doivent aussi être consignés. Ces résultats peuvent être inclus dans les moyennes des groupes, s'il y a lieu. La pertinence des résultats obtenus pour ces animaux et partant, la décision de les inclure ou non dans une moyenne de groupe, doit être appréciée au cas par cas.

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude de toxicité pour le développement prénatal doivent être évalués du point de vue des effets observés. L'évaluation doit comprendre les informations suivantes:

- les résultats des essais maternels et fœtaux, incluant une évaluation de la relation, ou de l'absence de relation, entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et la fréquence et la gravité de tous les effets observés,
- les critères appliqués pour catégoriser, le cas échéant, les altérations externes des fœtus, et les altérations de leurs tissus mous ou de leur squelette,

▼B

- selon les besoins, les données antérieures relatives aux témoins pour affiner l'interprétation des résultats de l'étude,
- les nombres utilisés pour calculer tous les pourcentages ou indices,
- l'analyse statistique appropriée des résultats de l'étude; il convient de fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Pour toute étude ne révélant aucun effet toxique, il y a lieu d'envisager des expériences complémentaires destinées à déterminer l'absorption et la biodisponibilité de la substance d'essai.

2.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude de la toxicité pour le développement prénatal fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance administrée durant la gestation sur les mères et sur le développement intra-utérin de leur progéniture. Les résultats de cette étude doivent être interprétés à la lumière de ceux des études de toxicité subchronique, de reproduction, des études toxicocinétiques et autres. Comme l'étude est centrée à la fois sur la toxicité générale du point de vue de la mère et sur la toxicité pour le développement, ses résultats permettront dans une certaine mesure de distinguer les effets sur le développement qui surviennent en l'absence d'une toxicité générale, des effets qui n'apparaissent qu'à des doses qui sont également toxiques pour la mère (27).

3. RAPPORT

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations particulières énumérées ci-dessous:

Substance d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,
- identification, y compris le numéro du CAS s'il est connu,
- pureté.

Véhicule (le cas échéant):

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

Animaux d'expérience:

- espèce et souche utilisée,
- nombre et sexe des animaux,
- origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai:

- justification du choix 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,

▼B

- 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,
- conditions ambiantes,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats:

Données relatives à la toxicité pour la mère en fonction des doses, précisant entre autres:

- le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de survivants, le nombre de femelles gravides, le nombre d'avortements et de mises bas prématurées,
- le jour de la mort si celle-ci est intervenue en cours d'essai et le nombre des animaux ayant survécu jusqu'au jour du sacrifice,
- les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date du sacrifice doivent être consignés, mais non inclus dans les comparaisons statistiques entre les groupes,
- le jour de l'observation de chaque signe clinique anormal et son évolution ultérieure,
- le poids corporel, sa variation et le poids de l'utérus gravide, y compris, si on le souhaite, la variation du poids corporel corrigée en fonction du poids de l'utérus gravide,
- la consommation de nourriture, et d'eau si elle a été mesurée,
- les résultats de l'autopsie, y compris le poids de l'utérus,
- les valeurs de la DSET se rapportant aux effets sur la mère et sur le développement.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées attestées par des implantations, notamment:

- nombre de corps jaunes,
- nombre d'implantations, nombre et pourcentage de fœtus vivants et morts et nombre de résorptions,
- nombre et pourcentage de pertes pré- et postimplantatoires.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées comportant des fœtus vivants, notamment:

- nombre et pourcentage de descendants vivants,
- proportion de mâles et de femelles,
- poids corporel des fœtus, de préférence par sexe et pour les deux sexes confondus;
- malformations externes, des tissus mous et du squelette et autres altérations pertinentes,
- critères de catégorisation, le cas échéant,

▼B

— nombre total et pourcentage de fœtus et de portées présentant une quelconque altération externe, des tissus mous ou du squelette; types et fréquence des différentes anomalies et autres altérations pertinentes.

Discussion

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
- (2) Kimmel, CA. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CUT Activities* 17; 1-8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32: 381-391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242..
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.
- (14) Kimmel, CA. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292.

▼ **M4****B.32. ÉTUDES DE CANCÉROGÈNE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 451 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 451 initiale sur les études de cancérogenèse a été adoptée en 1981. Sa révision a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (2) (3) (4) (5) (6). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.32 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.30 (études de toxicité chronique) et B.33 (études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai B.32 vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et au chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours – de la présente annexe (6). Des informations complémentaires peuvent aussi être trouvées dans le document d'orientation de l'OCDE n° 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).

4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de cancérogenèse. Bien que des études de cancérogenèse utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée ou par inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par voie cutanée (7) et par inhalation (7) (8). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur l'essai de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

▼ **M4**

5. L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas des substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

6. Les objectifs des études de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:
 - identification des propriétés cancérogènes d'une substance d'essai susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,

 - identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la cancérogenèse,

 - identification du temps d'apparition des néoplasmes,

 - caractérisation de la relation entre la dose administrée et la réponse tumorale,

 - identification du niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

 - extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,

 - obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle d'un produit chimique, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel cancérogène de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance d'essai est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).

8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La caractérisation du pouvoir cancérogène est effectuée après obtention des

▼M4

premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de la cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai (16) (17) (18) (19).

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: *«Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.»*

11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 12).

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (la présente méthode d'essai B.32). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une étude combinée (chapitre B.33 de la présente annexe), il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphe 11 et 22 à 25) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

▼M4

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation n° 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux, pendant la plus grande partie de leur vie, à des doses progressives et habituellement par la voie orale. Les essais par inhalation ou par la voie cutanée peuvent aussi être appropriés. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Choix des espèces animales**

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi qu'une telle étude n'est pas nécessaire sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation n° 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire

▼ M4

avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas $\pm 20\%$ du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Chaque groupe de dose, de même que chaque groupe témoin correspondant, comprend au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il est possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée entre les groupes de doses, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude, et sur le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique, dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude et groupes satellites (sentinelles)

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 12 mois, afin de recueillir des données sur la progression des altérations néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. S'ils sont néanmoins inclus dans l'étude, les groupes d'animaux traités destinés à être sacrifiés en cours d'étude comptent normalement 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). Des informations complémentaires figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).

▼ M4**Groupes de dose et dosage**

21. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.
22. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs mentionnés au paragraphe 23 ci-dessous, la plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.
23. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.
24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais 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 (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.
25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:
 - non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,
 - toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,
 - lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,
 - aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont modifiés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

▼ M4

- régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

- prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

26. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.
28. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu une solution ou une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).
29. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼ M4

30. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce normalement pendant une période de 24 mois pour les rongeurs (voir aussi le paragraphe 32). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 24 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 24 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).
31. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est donc pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

32. La durée de l'étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle pourra être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais cette décision fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).

— La clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent.

— La clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée.

— La survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe.

— L'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

▼ **M4**

OBSERVATIONS

33. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique devra aussi être effectuée une fois par jour en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage. Une attention particulière est accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

Poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, et efficacité alimentaire

34. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La consommation de nourriture et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la consommation d'eau dans les études où la prise d'eau est modifiée.

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

35. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7). S'il y a lieu, des prélèvements sanguins en vue d'analyses hématologiques et de chimie clinique et des analyses d'urines peuvent être effectués dans le cadre de sacrifices réalisés en cours d'étude (paragraphe 20) et à la fin de l'étude sur un minimum de 10 animaux de chaque sexe par groupe. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital sous anesthésie, et seront conservés si nécessaire dans des conditions appropriées. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène ait été mise en question (32).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

36. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20) font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles ne sont pas collectées au-delà d'un an après le début de l'étude.

▼ M4

37. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (33) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	cœur	pancréas	estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)
glande surrénale	iléon	glande parathyroïde	[dents]
aorte	jéjunum	nerf périphérique	testicule
cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	rein	hypophyse	thymus
cæcum	glande lacrymale (exorbital)	prostate	thyroïde
col utérin	foie	rectum	[langue]
glande coagulante	poumon	glande salivaire	trachée
côlon	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	vésicule séminale	vessie
duodénum	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	muscle squelettique	utérus (col inclus)
épididyme	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	peau	[uretère]
œil (y compris rétine)	œsophage	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	[urètre]
[fémur avec articulation]	[bulbe olfactif]	rate	vagin
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	ovaire	[sternum]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée
glande de Harder			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 et B.29 de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

▼ M4*Histopathologie*

38. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (33). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:
- tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,
 - tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
 - tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,
 - lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
 - dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORTS**Données**

39. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, 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 du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux synoptiques présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.
40. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.
41. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

42. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données d'identification,

▼ M4

- provenance de la substance chimique,
- numéro de lot,
- certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

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

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix fait,
- nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,
- provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification de la voie d'administration et du choix des doses,
- le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,
- données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

*Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)**Résultats généraux:*

- données sur la survie,
- poids corporel/variations du poids corporel,
- prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,
- données toxicocinétiques (si disponibles),
- ophtalmoscopie (si disponible),
- hématologie (si disponible),
- chimie clinique (si disponible).

▼ M4*Résultats cliniques:*

- signes de toxicité,
- incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,
- nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

- poids corporel à l'issue de l'essai,
- poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,
- résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

- observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,
- observations d'effets histopathologiques néoplasiques,
- corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,
- rapport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

*Traitement statistique des résultats, le cas échéant**Discussion des résultats, notamment:*

- examen de toutes les approches de modélisation,
- relations dose-réponse,
- données de contrôle historiques,
- examen de toutes les informations concernant le mode d'action,
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),
- applicabilité des résultats à l'être humain;

*Conclusions**BIBLIOGRAPHIE:*

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

- (6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique; Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.
- (7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE relatifs aux essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).
- (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) Chapitre B.8 de la présente annexe – Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (10) Chapitre B.29 de la présente annexe – Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (11) Chapitre B.9 de la présente annexe – Toxicité cutanée à doses répétées (28 jours).
- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.*, 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.
- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *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.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on the 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.

▼ **M4**

- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (32) Weingand K. *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ M4

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4**B. 33. ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGÈNE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 453 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 453 originale avait été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.33 actualisée a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4) (5). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.33 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.30 (Études de toxicité chronique) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).
2. La plupart des études de toxicité chronique et de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6) de la présente annexe, comme indiqué dans le document d'orientation n° 116 de l'OCDE sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).
3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).
4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse. Bien que des études à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (7) (8) et par voie cutanée (7). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

▼ **M4**

5. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas de substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.
6. Les objectifs des études de toxicité chronique et de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:
 - identification des propriétés cancérogènes d'un produit chimique susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,
 - identification du temps d'apparition de néoplasmes,
 - identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,
 - identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la toxicité chronique et de la cancérogenèse,
 - caractérisation de la relation dose-effet,
 - identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),
 - extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,
 - prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,
 - obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle et la toxicité chronique d'une substance d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement les propriétés toxicologiques de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).
8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent)

▼ M4

et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérigène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance chimique (16) (17) (18) (19).

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).
10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: *«Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.»*
11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre, entre d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas de l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse considérée ici.
12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser la présente étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, et un moindre recours aux animaux, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une telle étude combinée, il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphe 11 et 22 à 26) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées. On trouvera dans le document d'orientation n° 116 (7) des indications supplémentaires sur les moyens de concevoir de manière optimale l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et en rationalisant les diverses procédures expérimentales.

▼ **M4**

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation n° 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'étude comprend deux phases parallèles: une phase chronique et une phase de cancérogenèse (dont les durées respectives font l'objet des paragraphes 34 et 35). La substance d'essai est normalement administrée par la voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peuvent aussi être appropriées. Durant la phase chronique, la substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, à raison d'un niveau de dose par groupe, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 34). Cette durée est suffisamment longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être inclus dans l'étude (voir paragraphe 20). Durant la phase de cancérogenèse, la substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux pendant la plus grande partie de leur vie. Au cours des deux phases, les animaux sont observés attentivement pour déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Choix des espèces animales**

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi que de tels essais ne sont pas nécessaires sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique et de cancérogenèse avec des espèces de non-rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient suivre les principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi que dans le chapitre B.27 de la présente annexe – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (7).
16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation n° 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

▼ M4**Conditions d'hébergement et d'alimentation**

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas \pm 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE**Nombre et sexe des animaux**

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Pour les rongeurs, chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22) et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de cancérogenèse de l'étude comprend donc au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il sera possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée et non égale en nombre dans les divers groupes de dose, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. Chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22), et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de toxicité chronique de l'étude, comprend au moins, dans le cas des rongeurs, 10 animaux de chaque sexe. On notera

▼ M4

que ce nombre est plus faible que celui préconisé dans l'étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe). L'interprétation des données obtenues à partir de ce nombre réduit d'animaux par groupe dans la phase de toxicité chronique de la présente étude combinée s'appuie cependant sur les données provenant des animaux plus nombreux étudiés lors de la phase de cancérogenèse de l'étude. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe traité lors de la phase de toxicité chronique pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude et le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 6 mois pour la phase de toxicité chronique, afin de recueillir des données sur la progression des altérations non néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Les animaux étudiés pendant la phase de toxicité chronique de l'étude, normalement sur une durée de 12 mois (paragraphe 34), fournissent les données correspondant aux sacrifices en cours d'étude pour la phase de cancérogenèse, ce qui réduit le nombre total d'animaux étudiés. Des groupes satellites peuvent aussi être constitués pour la phase de toxicité chronique afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai. Ces investigations pourront ne porter que sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). On trouvera des indications supplémentaires sur les sacrifices en cours d'étude et sur le recours à des animaux satellites et sentinelles, ainsi que sur la limitation du nombre total d'animaux étudiés, dans le document d'orientation n° 116 (7).

21. Si l'inclusion d'animaux satellites et/ou des sacrifices en cours d'essai sont prévus, le nombre d'animaux dans chaque groupe de dose prévu à cet effet sera normalement de 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux étudiés devra être augmenté du nombre d'animaux devant être sacrifiés avant l'achèvement de l'étude. Les animaux destinés à être sacrifiés en cours d'étude et les animaux satellites sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique, et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosages

22. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, aussi bien pour la phase de toxicité chronique que pour la phase de cancérogenèse. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et devront prendre en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

▼ **M4**

23. Pour la phase de toxicité chronique de l'étude, une étude complète portant sur trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme indispensable s'il est possible d'anticiper qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ne produira probablement pas d'effets indésirables. La décision est fondée sur les résultats d'études préliminaires et sur l'absence probable de toxicité de la substance d'essai, compte tenu des données disponibles sur des substances structurellement apparentées. Une limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.
24. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. La plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.
25. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir le paragraphe 27). Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses. Le principal objectif lors de la réalisation d'une étude combinée de cancérogenèse et de toxicité chronique sera la collecte d'informations à des fins d'évaluation des risques de cancérogenèse, et les données sur la toxicité chronique seront normalement un objectif subsidiaire. Il conviendra de s'en souvenir lors du choix des niveaux de doses et des intervalles entre les doses pour l'étude.
26. Les intervalles entre les doses dépendront des objectifs de l'étude et des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits de manière détaillée dans la présente méthode d'essai, mais 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 (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.
27. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:
 - non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,
 - toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,
 - lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

▼ **M4**

- aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,
 - régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,
 - prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine, en particulier lors du choix des doses moyennes et faibles.
28. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

29. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.
30. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).
31. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances d'essai administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse normalement pas 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼ M4

32. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse) pour les rongeurs (voir aussi les paragraphes 33 et 34). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, donne lieu à une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour fait l'objet d'une justification. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).
33. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède normalement pas 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

34. Si la période d'administration et la durée de la phase chronique de cette étude sont normalement de 12 mois, le plan de l'étude permet une application à des essais de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Le traitement de tous les groupes de doses affectés à cette phase est interrompu au moment prévu pour l'évaluation de la toxicité chronique et de lésions pathologiques non néoplasiques. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition.
35. La durée de la phase de cancérogenèse de cette étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle peut être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais ce changement de durée fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7):

▼ **M4**

- la clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent,
- la clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée,
- la survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe,
- l'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

OBSERVATIONS (PHASE DE TOXICITÉ CHRONIQUE)

36. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.
37. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, 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 et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (32).
38. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traité à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres observations suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.
39. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (32) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (33) (34) (35) et une évaluation de la force de préhension (36) ainsi que de l'activité motrice (37) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.

▼ **M4**

40. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité alimentaire

41. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

Hématologie et biologie clinique

42. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur tous les animaux d'expérience (10 mâles et 10 femelles par groupe) à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 19). Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.
43. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent être également indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.
44. Des analyses de biochimie clinique, visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, sont superflus si

▼ **M4**

aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang ⁽¹⁾. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (39) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma- glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (39). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.

45. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (38): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.
46. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il est nécessaire de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (38). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 58), il convient d'envisager d'en obtenir.

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

47. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 21). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles pourra devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude.

⁽¹⁾ Pour un certain nombre de dosages effectués sur le sérum ou le plasma, et plus particulièrement pour le dosage du glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer des effets plus subtils ainsi que de rendre l'interprétation plus difficile. En revanche, le jeûne peut modifier le métabolisme général des animaux et, en particulier dans les études d'alimentation, perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Tous les animaux sont évalués dans le même état physiologique et il sera donc préférable de programmer les évaluations détaillées ou neurologiques pour un autre jour que celui des prélèvements de biochimie clinique.

▼ **M4**

48. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 47. Les glandes surrénales, le cerveau, les épидидymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation.
49. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions	macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)
muscle squelettique	rein	aorte	glande coagulante
nerf périphérique	[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder
[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)
œil (dont rétine)	thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)
œsophage	thyroïde	cœur	glande salivaire
ovaire	trachée	col utérin	glande surrénale
pancréas	[uretère]	côlon	hypophyse
parathyroïde	[urètre]	[dents]	iléon
peau	utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum
poumon	vagin	épididyme	[langue]
prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale estomac glandulaire)	(niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

▼ **M4**

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

50. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

- tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,
- tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
- tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,
- tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
- dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

OBSERVATIONS (PHASE DE CANCÉROGÈNESE)

51. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique est aussi effectuée une fois par jour. Dans le cas d'une étude par gavage, les animaux sont examinés immédiatement après l'administration de la dose. Une attention particulière devra être accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.
52. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

▼ **M4***Hématologie, biochimie clinique et autres mesures*

53. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision concernant ces prélèvements appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. Les données obtenues sur les animaux étudiés dans la phase de toxicité chronique, normalement d'une durée de 12 mois (voir paragraphe 34), renseignent sur ces paramètres. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7). Les éventuels prélèvements sanguins sont à recueillir à la fin de l'étude, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux. Ils sont effectués en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital, sous anesthésie. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène pendant la phase de cancérogenèse ait été mise en question (38).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

54. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20), font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles sont collectées dans l'année suivant le début de l'étude.
55. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)	muscle squelettique
rein	aorte	glande coagulante	nerf périphérique
[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]
testicule	cæcum	glande lacrymale (orbitale)	œil (dont rétine)
thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage
thyroïde	cœur	glande salivaire	ovaire
trachée	col utérin	glande surrénale	pancréas
[uretère]	côlon	hypophyse	parathyroïde

▼ **M4**

[urètre]	[dents]	iléon	peau
utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum	poumon
vagin	épididyme	[langue]	prostate
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale)	estomac glandulaire)	(niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou aspirat frais	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (autre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

56. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

- tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,
- tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
- tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,
- lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
- dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

▼ M4**RÉSULTATS ET RAPPORT (CANCÉROGENÈSE ET TOXICITÉ CHRONIQUE)****Résultats**

57. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, 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 du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.
58. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire, portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.
59. Si possible, les résultats numériques sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.
60. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données d'identification,
- provenance de la substance,
- numéro de lot,
- certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

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

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix fait,
- nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,
- provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

▼ M4*Conditions expérimentales:*

- justification de la voie d'administration et du choix des doses,
- le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,
- données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

- données sur la survie,
- poids corporel/variations du poids corporel,
- prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,
- données toxicocinétiques (si disponibles),
- ophtalmoscopie (si disponible),
- hématologie (si disponible),
- chimie clinique (si disponible).

Résultats cliniques:

- signes de toxicité,
- incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,
- nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

- poids corporel à l'issue de l'essai,
- poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,
- résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

- observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,
- observations d'effets histopathologiques néoplasiques,

▼ M4

- corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,
- apport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

- examen de toutes les approches de modélisation,
- relations dose-réponse,
- données de contrôle historiques,
- examen de toutes les informations concernant le mode d'action,
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),
- applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445
- (6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Essai de toxicité subchronique par voie orale – Toxicité orale à doses répétées – non rongeurs: 90 jours.
- (7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).
- (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) Chapitre B.8 de la présente annexe. Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (10) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (11) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité à doses répétées (28 jours) (administration cutanée).

▼ M4

- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol*, 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol*. 33:581-589.
- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci*. 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol*. 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol*. 36, 1-7.
- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 69-98.
- (20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on the 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.
- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturo A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol*. 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.

▼ **M4**

- (27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (35) 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.
- (36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (37) 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.
- (38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ M4

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B**B.34 TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée à des doses croissantes à plusieurs groupes d'animaux mâles et femelles. Les mâles devraient être traités durant leur croissance et pendant au moins un cycle complet de spermatogenèse (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de permettre à la substance de produire quelques effets nocifs sur la spermatogenèse.

Les femelles de la génération P seront traitées pendant au moins deux cycles œstraux complets afin de permettre à la substance testée de produire quelques effets nocifs sur l'œstrus. Les animaux sont ensuite accouplés. La substance testée est administrée aux animaux des deux sexes pendant la période d'accouplement, puis uniquement aux femelles durant la période de gestion et d'allaitement. Si l'on veut administrer la substance par voie respiratoire (inhalation), la méthode nécessite des adaptations.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI*Préparations*

Avant l'essai, de jeunes animaux adultes et sains sont randomisés et répartis par groupes traités et témoins. Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Il est recommandé d'administrer la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson. D'autres voies d'administration sont également acceptables. La même méthode d'administration sera utilisée pour tous les animaux durant la période expérimentale appropriée. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le traitement, ils devraient être reconnus sans effet toxique. Le traitement devrait être effectué pendant les 7 jours de la semaine.

▼B**A n i m a u x d ' e x p é r i e n c e**

Choix de l'espèce:

L'espèce convenant le mieux est celle du rat ou de la souris. Des souches à faible taux de fécondité ne devraient pas être utilisées. Des animaux sains n'ayant pas été déjà utilisés dans une expérimentation devraient être utilisés. L'espèce, la souche, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience seront spécifiés.

Pour évaluer de façon adéquate la fécondité, mâles et femelles devraient tous deux être étudiés. Tous les animaux traités et témoins devraient être sevrés avant le début du traitement.

Nombre et sexe:

Chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait comporter un nombre d'animaux suffisant pour obtenir environ 20 femelles gravides arrivées à terme ou proches de celui-ci.

L'objectif est d'obtenir un nombre de gestations et de portées suffisant pour permettre une évaluation valable de l'influence de la substance sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel des animaux de la génération P ainsi que l'allaitement, la croissance et le développement de la génération F₁, de la conception au sevrage.

C o n d i t i o n s d ' e s s a i

La nourriture et l'eau devraient être fournies à satiété. Lorsqu'elles seront proches du terme, les femelles gravides devraient être placées dans des cages individuelles de mise bas ou de maternité et il peut leur être fourni les matériaux de nidification nécessaires.

D o s e s

Au moins trois groupes traités et un groupe témoin seront utilisés. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance testée, le groupe témoin recevra le volume maximal de véhicule ayant été utilisé. Si une substance à tester entraîne une réduction de la consommation alimentaire ou de l'assimilation, il peut être nécessaire d'utiliser un groupe témoin apparié. Dans les conditions idéales et à moins que la nature physique/chimique ou les effets biologiques de la substance testée ne s'y opposent dans une certaine mesure, le niveau de dose le plus élevé produira un effet toxique sans toutefois entraîner la mort des animaux parentaux (P). La(les) dose(s) intermédiaire(s) devrait(ent) produire des effets toxiques minima attribuables à la substance testée, et la dose faible ne devrait produire aucun effet nocif observable sur les parents ou leur progéniture. Lorsque la substance est administrée par gavage ou en capsule, la dose administrée à chaque animal devrait être établie en fonction du poids corporel de chaque animal et fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire afin de tenir compte des modifications de poids corporel. Pour les femelles pendant la gestation, le traitement peut, si on le souhaite, être établi en fonction du poids corporel au jour 0 ou au jour 6 de la gestation.

E s s a i d e l i m i t e

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si un niveau de dose d'au moins 1 000 mg/kg n'entraîne aucune interférence sur les capacités de reproduction, des études à d'autres niveaux de doses peuvent être considérées non nécessaires. Si une étude préliminaire effectuée avec le niveau de dose élevé, avec une toxicité évidente chez la mère, n'a aucun effet nocif sur la fertilité, on peut juger inutile d'effectuer des études avec d'autres niveaux de doses.

▼B*Mode opératoire*

Plan d'expérience

On devrait commencer à administrer quotidiennement la substance aux mâles géniteurs (P) lorsqu'ils auront atteint l'âge de 5 à 9 semaines, après qu'ils auront été sevrés et acclimatés pendant au moins 5 jours. Chez les rats, le traitement est poursuivi pendant 10 semaines, avant la période d'accouplement (pour les souris, 8 semaines). Les mâles devraient être sacrifiés et examinés soit à la fin de la période d'accouplement soit alternativement maintenus en vie avec poursuite de l'administration de la substance dans la nourriture, en vue de la production éventuelle d'une seconde portée, et devraient être sacrifiés et examinés à un moment avant la fin de l'étude. Dans le cas des femelles (P), le traitement devra commencer après au moins 5 jours d'acclimatation et se poursuivre pendant au moins 2 semaines avant l'accouplement. Les femelles P devraient continuer à recevoir leur traitement quotidien durant les 3 semaines de la période d'accouplement, durant la gestation et jusqu'au sevrage des petits F₁. Des modifications du schéma de traitement peuvent être envisagées au cas où l'on disposerait d'autres informations sur la substance étudiée, comme l'induction du métabolisme ou la bio-accumulation.

Procédure d'accouplement

Dans les études de toxicité sur la fonction de reproduction, les accouplements peuvent se faire soit 1:1(1 mâle, 1 femelle) soit 1:2 (1 mâle, 2 femelles).

Dans le cas d'un accouplement 1:1, une femelle sera placée avec le même mâle jusqu'à ce qu'elle soit gravide ou que les 3 semaines se soient écoulées. On examinera les femelles chaque matin afin de relever la présence de sperme ou de bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme le jour où l'on constate la présence de bouchon vaginal ou de sperme.

Tous les couples ayant failli à l'accouplement devraient être examinés afin de déterminer la cause de l'apparente stérilité.

Ceci peut impliquer des procédures qui permettent des conditions d'accouplement avec des mâles ou des femelles ayant déjà procréé, de procéder à un examen microscopique des organes de reproduction ou à un examen du cycle œstral ou de la spermatogenèse.

Taille de la portée

On laisse les animaux traités durant l'étude de fertilité mettre bas naturellement et élever librement leurs petits jusqu'au sevrage.

Quand une méthode d'homogénéisation des portées est effectuée, il est suggéré d'appliquer le programme suivant: entre le jour 1 et le jour 4 après la naissance, la taille de chaque portée peut être adaptée en éliminant, par sélection, des petits afin d'obtenir, dans toute la mesure du possible, 4 mâles et 4 femelles par portée.

Si le nombre de mâles ou de femelles ne permet pas d'obtenir 4 petits de chaque sexe par portée, un ajustement partiel peut être accepté (par exemple 5 mâles et 3 femelles). Des ajustements ne sont pas possibles pour les portées de moins de 8 petits.

▼B**Observations**

Pendant toute la période d'essai, chaque animal devrait être observé au moins une fois par jour. Des modifications comportementales significatives, des signes de parturition difficile ou prolongée ainsi que tous les signes de toxicité, y compris la mortalité, devraient être enregistrés. Pendant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, la consommation alimentaire sera déterminée quotidiennement. Après la parturition et durant la lactation, la consommation alimentaire ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson devraient être déterminées le jour de la pesée des petits. Les mâles et les femelles P devraient être pesés le premier jour du traitement, puis toutes les semaines. Ces observations devraient être notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation devrait être calculée à partir du jour 0 de la gravidité. Chaque portée devrait être examinée dès que possible après la naissance afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, les mort-nés, les nouveau-nés vivants et la présence d'anomalies macroscopiques.

Les petits morts et les petits sacrifiés le quatrième jour devraient être conservés et examinés en vue de déceler d'éventuelles anomalies. Les petits vivants devraient être comptés et les portées pesées le matin qui suit la naissance ainsi que le quatrième et le septième jour, puis chaque semaine jusqu'au terme de l'étude, où les animaux devraient être alors pesés individuellement.

Les anomalies physiques ou comportementales observées chez les mères ou les petits seront enregistrées.

*Pathologie***Autopsie**

Au moment du sacrifice ou de la mort en cours d'étude, les animaux de la génération P devraient être soumis à un examen macroscopique afin de déceler toute anomalie structurelle ou toute modification pathologique; une attention particulière étant accordée aux organes de l'appareil de reproduction. Les petits, morts ou moribonds, seront examinés du point de vue des malformations.

Histopathologie

Les ovaires, l'utérus, le col utérin, le vagin, les testicules, l'épididyme, les vésicules séminales, la prostate, la glande coagulante, l'hypophyse et l'(les) organe(s) cible(s) de tous les animaux P seront conservés en vue d'un examen microscopique. Au cas où ces organes n'ont pas été examinés au cours d'autres études à dose multiple, ils devraient être soumis à l'examen histologique pour tous les animaux traités à la dose élevée, tous les animaux témoins ainsi que ceux morts en cours d'expérience, lorsque c'est faisable.

Les organes présentant des anomalies chez ces animaux devraient alors être examinés chez tous les autres animaux P. Dans ce cas, l'examen microscopique sera effectué pour tous les tissus présentant des modifications pathologiques macroscopiques. Comme suggéré dans les procédures d'accouplement, les organes reproducteurs des animaux soupçonnés de stérilité seront soumis à un examen microscopique.

▼B**2. RÉSULTATS**

Les résultats peuvent être résumés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de mâles féconds, le nombre de femelles gravides, le type de modifications et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de modification.

Lorsque c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RAPPORT**3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce/souche utilisée,
- réponse toxique par sexe et par dose, y compris fécondité, gestation et viabilité,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication si l'animal était encore en vie au moment prévu pour le sacrifier à l'issue de l'étude,
- tableau présentant les poids de chaque portée, les poids moyens des petits et les poids individuels des petits à l'issue de l'étude,
- effet toxique ou autre sur la reproduction, la descendance, la croissance post-natale,
- jour de l'observation de tout signe anormal et évolution subséquente,
- poids corporel des animaux P,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée des observations microscopiques,
- traitement statistique des résultats, quand cela est nécessaire,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

▼B**B.35 ÉTUDE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS****1. MÉTHODE**

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai n° 416 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai 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 mâle et femelle, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gestation, 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 méthode étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, 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 par des études décrites dans les méthodes d'essai relatives à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou en procédant à des études séparées à l'aide de méthodes d'essai appropriées.

1.2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

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 mettre en évidence tous ses effets nocifs sur la spermatogenèse. 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 spermatogenèse provenant d'une précédente étude à doses répétées de durée suffisante, par exemple 90 jours, il n'est pas nécessaire d'inclure les mâles de la génération P dans l'évaluation. Il est toutefois recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements numériques du sperme de la génération P, en vue d'une évaluation ultérieure. Les femelles de la génération P doivent être traitées durant la croissance et pendant plusieurs cycles œstraux complets de manière à pouvoir détecter tous les effets nocifs de la substance d'essai sur le cycle œstral. La substance d'essai est administrée aux animaux de la génération P durant la période d'accouplement, pendant les gestations qui en résultent et jusqu'au sevrage de la 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.

Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité; cet examen s'attache en particulier à l'évaluation des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance.

▼B

1.3 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.3.1 **Choix des espèces**

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 à faible taux de fécondité ou chez lesquelles l'incidence des anomalies du développement est notablement élevée sont à proscrire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés doit être minimale et ne doit pas dépasser 20 % du poids moyen des représentants de chaque sexe.

1.3.2 **Conditions d'encagement et d'alimentation**

L'animalerie doit être à 22 °C (+ 3 °C), avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 %, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. 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.

Les animaux peuvent être encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe. L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. 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.

1.3.3 **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser de jeunes animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Il importe de connaître les liens collatéraux 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 (il est recommandé de les regrouper par tranche de poids corporel). Les cages sont placées de manière à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur disposition. Chaque animal est désigné par un numéro d'identification propre. Les animaux de la génération P doivent être identifiés avant le début du traitement; ceux de la génération F1 qui sont sélectionnés pour l'accouplement seront identifiés 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.

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

▼B

1.4. MODE OPÉRATOIRE

1.4.1. **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe d'essai ou témoin doit comporter un nombre d'animaux suffisant pour que l'on puisse disposer en fin d'essai d'au moins 20 femelles gravides à 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. Le but est d'obtenir suffisamment de femelles gravides pour pouvoir procéder à une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gestation, 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. En conséquence, le fait de ne pas avoir obtenu le nombre souhaité de femelles gravides (c'est-à-dire 20) n'invalide pas nécessairement l'étude, et la situation doit être évaluée au cas par cas.

1.4.2. **Préparation des doses**

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) ne soit jugée plus adéquate.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension 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.

1.4.3. **Dosage**

On utilise au moins trois doses différentes et un témoin en parallèle. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit faire apparaître une certaine toxicité, sans entraîner la mort ni provoquer de souffrances aiguës. En cas de mortalité inattendue, si le taux de mortalité de la génération parentale est inférieur à environ 10 pour cent, l'étude reste en générale acceptable. Il convient de choisir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet ainsi qu'une dose sans effets toxiques (DSET). L'écart optimal entre chaque dose de la série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre, et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, l'écart entre les doses ne doit pas être supérieur à un facteur 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 apparenté doit également être prise en considération. Ces informations serviront aussi à justifier l'échelle des doses.

▼B

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin seront traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Lorsque la substance d'essai est administrée mélangée aux aliments et qu'il en résulte une diminution de la prise ou la consommation de nourriture, il peut s'avérer nécessaire d'adjoindre un groupe témoin nourri en parallèle. 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 nourri en parallèle.

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

1.4.4. Essai limite

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 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, n'entraîne pas de signes de toxicité observables chez les parents ou dans leur progéniture et qu'aucun effet toxique n'est escompté au vu des données disponibles concernant des 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 n'a pas de raison d'être lorsque le niveau d'exposition humaine implique l'utilisation d'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 sa solubilité, limitent souvent la concentration maximale applicable.

1.4.5. Administration des doses

Les animaux reçoivent la substance d'essai quotidiennement, sept jours sur sept. 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 convient de justifier ce choix et d'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 doit 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. Sauf dans le cas de substances irritantes ou corrosives dont les effets s'intensifient généralement aux concentrations supérieures, il y a lieu de réduire 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 reçoivent normalement la substance d'essai qu'indirectement, par le lait maternel, jusqu'à ce que l'administration directe débute pour eux, à partir du sevrage. Lorsque la substance d'essai est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits reçoivent aussi la substance d'essai directement dès qu'ils commencent à s'alimenter seuls, lors de la dernière semaine d'allaitement.

▼B

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 à peu près à la même heure chaque jour 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.

1.4.6. Programmes expérimentaux

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 que, lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il est possible que les petits de la génération F1 soient déjà exposés directement à la substance durant 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 d'accouplement. Le traitement sera poursuivi pour les deux sexes durant les deux semaines de la période d'accouplement. Les mâles qui ne serviront pas 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 la gestation et jusqu'au sevrage de leur descendance F1. Il sera peut-être nécessaire de modifier le programme d'administration des doses à la lumière des informations disponibles sur la substance d'essai, notamment en ce qui concerne la toxicité, l'induction métabolique ou la bioaccumulation. La dose administrée à chaque animal est normalement calculée d'après les résultats de la dernière pesée de l'animal. Toutefois, la prudence s'impose lors de l'ajustement de la dose au cours du dernier tiers de la gestation.

Le traitement des mâles et des femelles P et F1 se poursuit jusqu'à leur sacrifice. Tous les adultes mâles et femelles P et F1 qui ne sont plus nécessaires pour l'évaluation des effets sur la reproduction doivent être euthanasiés. Les descendants F1 qui n'ont pas été sélectionnés pour l'accouplement et tous les descendants F2 seront euthanasiés après le sevrage.

1.4.7. Accouplement**1.4.7.1. *Accouplement de la génération parentale (P)***

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 gestation 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 ayant fait leurs preuves. Les couples doivent être clairement identifiés dans les résultats. On évitera d'accoupler des membres d'une même fratrie.

▼B1.4.7.2 *Accouplement de la génération F1*

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.

On évaluera les couples sans descendance afin de déterminer la cause apparente de leur stérilité. À cet effet, on pourra donner aux animaux d'autres occasions de s'accoupler avec d'autres mâles ou femelles ayant fait leurs preuves, effectuer un examen microscopique des organes reproducteurs, ou analyser les cycles œstraux ou la spermatogenèse.

1.4.7.3 *Deuxième accouplement*

Dans certains cas, notamment lorsque la taille de la portée est modifiée par le traitement ou lorsqu'un effet équivoque est observé dans le premier accouplement, on préconise d'accoupler une deuxième fois les adultes P ou F1, afin d'obtenir une deuxième portée. Il est recommandé 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, le deuxième accouplement doit avoir lieu environ une semaine après le sevrage de la dernière portée.

1.4.7.4 *Taille de la portée*

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.

1.5. **OBSERVATIONS**1.5.1. **Observations cliniques**

Une observation clinique générale est réalisée chaque jour; en cas d'administration par gavage, l'heure à laquelle cette observation est réalisée doit tenir compte du moment où l'on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale après administration. On notera les changements de comportement, les signes de mise-bas prolongée ou difficile et tous les symptômes de toxicité. En outre, au moins une fois par semaine, chaque animal devra faire l'objet d'un examen plus détaillé qui pourrait être aisément réalisé à l'occasion d'une pesée de l'animal. Deux fois par jour et une fois par jour pendant le week-end, selon les besoins, on recherchera des signes de morbidité et de mortalité sur tous les animaux.

▼B**1.5.2. Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau des animaux parents**

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 aux jours 0, 7, 14, et 20 ou 21 de la gestation, puis aux mêmes jours que leurs petits durant l'allaitement, et enfin le jour de leur sacrifice. Les résultats sont consignés individuellement pour chaque animal adulte. Durant la période qui précède l'accouplement et pendant la gestation, la consommation de nourriture est mesurée 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.

1.5.3. Cycle œstral

La durée et la normalité du cycle œstral 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 constatation de preuves d'accouplement. Les cellules vaginales ou cervicales seront prélevées avec soin pour éviter d'agresser la muqueuse et d'induire ainsi une pseudogestation (1).

1.5.4. Paramètres d'évaluation du sperme

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 1.5.7, 1.5.8.1). On réservera les testicules et les épидидymes d'un sous-lot composé d'au moins dix mâles de chaque génération (P et F1) pour la numération des spermatozoïdes résistants à l'homogénéisation et des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme. Dans ce même sous-lot 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 sont observés ou si d'autres études révèlent que la substance peut avoir des effets sur la spermatogénèse, l'évaluation du sperme sera réalisée sur tous les mâles traités aux différentes doses; dans le cas contraire, on pourra limiter la numération aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée.

Il convient de dénombrer la totalité des spermatozoïdes testiculaires résistants à l'homogénéisation et des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (2) (3). 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-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice, à moins qu'on ne réalise des enregistrements vidéo ou numériques ou qu'on ne congèle des échantillons en vue d'une analyse ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité 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 groupes traités aux autres doses. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la dose la plus élevée, on évaluera aussi les groupes traités aux doses plus faibles.

▼B

La motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme ou le canal déférent est évaluée ou enregistrée sur support vidéo immédiatement après le sacrifice. Le sperme, 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 (4). Il convient d'évaluer subjectivement ou objectivement le pourcentage de spermatozoïdes devenant progressivement mobiles. Si l'on pratique une analyse du mouvement assistée par ordinateur (5) (6) (7) (8) (9) (10), la motilité progressive est évaluée d'après les seuils définis par l'utilisateur pour la vitesse moyenne de trajectoire, la rectilignité ou l'index linéaire. Si les échantillons sont enregistrés en vidéo (11) ou si les images sont enregistrées d'une autre manière au moment de l'autopsie, l'analyse subséquente pourra se limiter aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, à moins que des effets liés au traitement n'aient été observés, auquel cas il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles. En l'absence d'une image vidéo ou numérique, tous les échantillons de tous les groupes traités devront être analysés lors de l'autopsie.

On procédera à une évaluation morphologique d'un échantillon de sperme de l'épididyme ou du canal déférent. Les spermatozoïdes (au moins 200 par échantillon) doivent être examinés dans des préparations fixées et en milieu liquide (12), puis classés en tant que spécimens 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 doit être réalisée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice ou ultérieurement à partir des enregistrements vidéo ou numériques. Les frottis, une fois fixés, peuvent aussi être analysés à une date ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité 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 groupes traités aux autres doses devient superflue. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la plus dose élevée, il convient d'évaluer également les groupes traités aux doses plus faibles.

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 de conserver des échantillons ou des enregistrements vidéo du sperme de la génération P, pour permettre une évaluation ultérieure si nécessaire.

1.5.5. Descendance

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 mortalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques. Les petits trouvés morts au jour 0 seront de préférence examinés, s'ils ne sont pas macérés, afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies et de déterminer la cause de la mort, et conservés. 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 notera les anomalies physiques et comportementales observées chez les mères ou les petits.

▼B

Le développement physique de la descendance est consigné essentiellement sous la forme du gain 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 sont de préférence réservées à l'évaluation de la maturité sexuelle (âge et poids corporel au moment de l'ouverture vaginale ou de la séparation balano-préputiale, par exemple) (13). Il est recommandé de réaliser des explorations fonctionnelles (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 ou la séparation balano-préputiale chez les descendants F1 tout juste sevrés qui ont été sélectionnés en vue de l'accouplement. Il convient de mesurer la distance ano-génitale chez les petits F2, le jour de leur naissance, si l'on a constaté une modification de la proportion de mâles et de femelles ou de l'âge de maturation sexuelle dans la génération F1.

Les observations fonctionnelles ne s'imposent plus pour les groupes présentant des signes évidents de toxicité (diminution sensible de la prise de poids, etc., par exemple). Les explorations fonctionnelles, le cas échéant, seront réalisées sur les petits non sélectionnés pour l'accouplement.

1.5.6. Examen macroscopique

Juste après le sacrifice ou la mort si celle-ci survient en cours d'étude, tous les animaux parents (P et F1), tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques, ainsi qu'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) sont soumis à un examen macroscopique destiné à révéler d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. L'examen des organes reproducteurs doit faire l'objet d'une attention particulière. Il y a lieu d'examiner les petits moribonds qui ont été euthanasiés ainsi que les petits morts, s'ils ne sont pas macérés, afin de détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de la mort, et de les conserver.

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.

1.5.7. Pesée des organes

Juste après le sacrifice, on détermine le poids corporel de tous les parents P et F1 ainsi que le poids des organes suivants (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, et prostate (ensemble),
- cerveau, foie, reins, rate, hypophyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus.

Les poids corporels des petits F1 et F2 retenus pour l'autopsie sont déterminés après le sacrifice, de même que le poids du cerveau, de la rate et du thymus d'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard (voir paragraphe 1.5.6).

▼B

Si possible, les résultats de l'autopsie et de la pesée des organes doivent être interprétés à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées.

1.5.8. **Histopathologie**

1.5.8.1. *Animaux parents*

Les organes et tissus ci-après des animaux parents (P et F1), ou des échantillons représentatifs de ces derniers, sont fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique.

- vagin, utérus avec col, et ovaires (conservés dans un fixateur approprié),
- un testicule (conservé dans un fixateur approprié), un épидидyme, les vésicules séminales, la prostate et une glande coagulante,
- organe(s) cible(s) précédemment identifié(s) de tous les animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement.

Tous les animaux P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, qui ont été sélectionnés pour l'accouplement, doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet des organes et tissus susmentionnés. L'examen des ovaires des femelles P est facultatif. Il convient également d'examiner les organes présentant des altérations liées au traitement dans les groupes traités à la dose la plus faible et à la dose intermédiaire, afin de faciliter la détermination de la DSET. 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, qui n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains, ou ceux chez qui on a constaté des modifications du cycle œstral ou du nombre, de la motilité ou de la morphologie des spermatozoïdes. Toutes les lésions macroscopiques telles qu'atrophies ou tumeurs doivent être examinées.

Un examen histopathologique détaillé des testicules doit être effectué (par exemple, fixation dans du liquide de Bouin, inclusion dans la paraffine et coupes transversales de 4-5 µm d'épaisseur) afin de mettre en évidence des effets liés au traitement, notamment une rétention de spermatides, l'absence de certaines couches ou types de cellules germinales, la présence de cellules géantes multinucléées ou le décollement des cellules spermatogènes dans la lumière des tubules séminifères (14). L'examen d'un épидидyme intact doit porter sur la tête, le corps et la queue, ce qui peut être effectué sur 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.

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 doit 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 doivent être statistiquement valables pour la méthode d'évaluation employée. L'examen comprend 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 (15) (16) (17) (18) (19).

▼B1.5.8.2. *Petits sevrés*

Les tissus présentant des anomalies macroscopiques et les organes cibles de tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques ainsi que ceux du petit/du sexe/de la portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) et non retenu(e) pour l'accouplement seront fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique. La description histopathologique complète des tissus conservés sera plus particulièrement axée sur les organes reproducteurs.

2. RÉSULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus sur chaque animal seront consignés 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 morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de la mort ou de 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.

Les résultats numériques seront évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et reconnue; le choix des méthodes statistiques doit intervenir lors de la conception de l'étude et doit être justifié. Les modèles statistiques s'appliquant aux relations «dose-effet» peuvent être utiles à l'analyse des résultats. Le rapport doit 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.

2.2 ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les résultats de cette étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations doivent 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 administrée de substance d'essai et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment lésions macroscopiques, organes cibles identifiés, altération de la fertilité, anomalies cliniques, altération de la capacité de reproduction et des performances de la portée, modifications du poids corporel, effets sur la mortalité et tout autre effet toxique. Les propriétés physicochimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques doivent être prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

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

▼B

2.3 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations fournit des informations sur les effets d'une 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 doivent être interprétés à la lumière des résultats des études subchroniques, prénatales, de développement, toxicocinétiques et autres disponibles. Les résultats de la présente étude peuvent servir à apprécier la nécessité de réaliser d'autres essais sur une substance chimique. L'extrapolation des résultats de l'étude à l'homme présente un intérêt limité. Ces résultats se prêtent davantage à la détermination des concentrations sans effet et des niveaux d'exposition humaine acceptables (20) (21) (22) (23).

3. **RAPPORT**

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques
- identification
- 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 des animaux
- origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc.
- poids de chaque animal au début de l'essai

Conditions d'essai:

- justification du choix des doses
- détails concernant la formulation de la substance d'essai/son incorporation aux aliments, la concentration obtenue
- stabilité et homogénéité de la préparation;
- détails concernant 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.

▼B

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;
- données relatives aux portées et au 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);
- date de mort en cours d'étude ou animaux ayant survécu jusqu'au sacrifice;
- manifestation de la toxicité par sexe et par dose, y compris indices d'accouplement, de fécondité, de gestation, de natalité, de viabilité et d'allaitement; le rapport doit mentionner les chiffres ayant servi au calcul de ces indices;
- 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 ayant un cycle normal et durée 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 gestation;
- nombre d'implantations, de corps jaunes, taille de la portée;
- nombre de naissances vivantes et de pertes postimplantatoires;
- nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques; nombre de rabougris s'il a été déterminé;
- paramètres physiques évalués sur les petits et autres données sur le développement postnatal; il y a lieu de justifier les paramètres physiques évalués;
- observations fonctionnelles réalisées sur les petits et sur les adultes, suivant le cas;
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

▼**B**

Discussion

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

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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
- (5) 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(3):237-244.
- (6) Chapin, R.E. et al, (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulfonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (9) 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.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologie and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401-415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility, *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (12) 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.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298-303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) 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.
- (17) 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.

▼B

- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼ **M4****B.36. TOXICOCINÉTIQUE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 417 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les études portant sur la toxicocinétique d'une substance chimique d'essai 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 substances 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 méthode d'essai suppose l'administration orale de la substance d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. Les régimes réglementaires 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, la présente méthode d'essai décrit des essais de toxicocinétique impliquant des mesures et des effets observés multiples. À l'avenir, plusieurs nouvelles méthodes d'essai 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 méthode d'essai, ce sont les exigences et/ou besoins de chaque dispositif réglementaire qui déterminent les essais ou l'évaluation à mettre en œuvre.

▼ **M4**

7. De nombreuses études peuvent être réalisées pour évaluer à des fins réglementaires le comportement toxicocinétique d'une substance d'essai. 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 d'essai. Dans certains cas, l'étude d'une série précise de questions peut suffire à cerner les dangers et les risques associés à la substance d'essai. 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 de la substance d'essai 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 d'essai 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 physico-chimiques, comme le coefficient de partage octanol-eau ($\log P_{OE}$), le pKa, 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 méthodes d'essai permettront de les déterminer

LIMITATIONS

9. La présente méthode d'essai 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 méthode B.36 peuvent fournir des informations susceptibles d'orienter la conception d'études spécifiques sur ces sujets. La présente méthode d'essai 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 ligne directrice 417 (équivalente à la présente méthode d'essai) peut ne pas s'appliquer à ces derniers (1).

DÉFINITIONS

10. Les définitions utilisées aux fins de la présente méthode d'essai figurent en appendice.

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 méthode d'essai.

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.

▼ M4**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 méthode d'essai suppose le rat comme espèce d'essai. Certains aspects de cette méthode d'essai 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 d'essai.

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,

▼ **M4**

alors il n'est pas nécessaire de recourir à une substance d'essai radiomarquée. 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 de la substance d'essai. 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 CO₂, et n'est pas incorporée dans l'ensemble des radicaux mono-carbonés 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 de la substance d'essai.

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 méthode d'essai.

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.

▼ M4

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 au chapitre B.2 de la présente annexe; 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 du dispositif réglementaire en vigueur. 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

▼ **M4**

sanguines. Si la substance d'essai 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 la substance d'essai 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 et le véhicule leur soient injectés.

30. D'autres voies d'administration, comme la voie cutanée et l'inhalation (voir paragraphes 74 à 78) peuvent également convenir pour certaines substances d'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques 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:

$$\text{Pourcentage d'absorption} = \frac{(\text{quantités présentes dans la bile} + \text{l'urine} + \text{l'air expiré} + \text{la carcasse hors tractus gastro-intestinal})}{\text{quantité administrée}} \times 100$$

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.

▼ **M4***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 (ses) 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 (ses) métabolite(s) pertinents s'effectue alors comme suit:

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

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 d'essai 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 d'essai 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). Lorsque aucune substance d'essai n'est 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.

▼ M4

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 substances d'essai ayant été caractérisées, 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.

▼ M4*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 d'essai (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 d'essai 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.

▼ **M4**

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 d'essai 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 d'essai. 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;

▼ **M4**

- 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 méthode d'essai, des méthodes complémentaires peuvent fournir des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination d'une substance d'essai chez certaines espèces.

Utilisation d'informations in vitro

59. Plusieurs aspects concernant le métabolisme de la substance d'essai 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 d'essai 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 d'essai 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).

▼ M4

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 d'essai sur 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 à la substance d'essai 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).

▼ **M4****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 méthode d'essai, 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 physico-chimiques 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;

▼ **M4**

- 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'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'appendice 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 spectro-métriques 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 d'essai 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.

▼ M4

- 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.

▼ M4

AUTRES VOIES D'EXPOSITION

Voie cutanée*Traitement cutané*

74. Cette section fournit des renseignements spécifiques sur les études de toxicocinétique par voie cutanée. Pour l'absorption cutanée, il convient de consulter le chapitre B.44 [Absorption cutanée: méthode in vivo (9)] de la présente annexe. Pour d'autres effets observés, tels que la distribution et le métabolisme, la présente méthode d'essai B.36 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 méthode d'essai. 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 d'essai 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 méthode d'essai (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 (2), et la peau traitée est prélevée. Une section appropriée de la peau traitée est analysée pour déterminer la présence résiduelle de la substance d'essai (radioactivité).
77. Pour l'évaluation toxicocinétique des produits pharmaceutiques, des procédures différentes peuvent être nécessaires, en accord avec les dispositions réglementaires.

▼ **M4****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 méthode d'essai. 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; Environmental Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000), 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 H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 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) Chapitre B.45 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vitro.
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Genève, Organisation mondiale de la santé, Programme international sur la sécurité des substances chimiques.
- (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) Chapitre B.44 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vivo.
- (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) Gibaldi M. and Perrier D., (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼ **M4***Appendice*

DÉFINITIONS

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.

Absorption: processus par le(s)quel(s) une substance chimique 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».

Accumulation (bioaccumulation): augmentation dans le temps de la quantité d'une substance d'essai présente dans les tissus (généralement les tissus adipeux, à la suite d'une exposition répétée); si une substance d'essai 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 de «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 d'essai dans le plasma. Cette aire correspond à la quantité totale de substance d'essai 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 d'essai absorbée par le corps, indépendamment du taux d'absorption.

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.

Autoradiographie (autoradiographie du corps entier): cette technique, qui sert à déterminer qualitativement et/ou quantitativement la localisation tissulaire d'une substance d'essai 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.

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».

▼ **M4**

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 d'essai 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 (10). 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 l'organisme, d'une substance d'essai 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 chimique dans deux solvants.

Compartiment: portion (ou unité) structurale 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 d'essai présente dans l'ensemble du corps.

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

Distribution tissulaire: déplacement réversible d'une substance d'essai 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 biliaire: excrétion par les voies biliaires.

▼ M4

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

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 d'essai produit son effet. Le mode d'action se rapporte aux phénomènes plus généraux conduisant à la toxicité d'une substance d'essai.

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.

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

Persistance (biopersistance): présence à long terme d'une substance chimique (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 une ou plusieurs substances chimiques sont utilisées pour prédire l'effet observé pour la substance 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.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

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

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

▼ M4

Toxicocinétique (pharmacocinétique): étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances chimiques 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 d'essai 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 chimique 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 détoxification: série d'étapes conduisant à l'élimination des substances chimiques toxiques du corps, que ce soit par transformation métabolique ou par excrétion.

▼B**B.37 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage *in vitro* peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'essais *in vitro* ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase — NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Une substance de référence peut être testée sur un lot témoin positif, afin de démontrer que, dans les conditions de l'essai, la réaction de l'espèce testée n'est pas modifiée de façon significative.

Le tri-*o*-tolyi phosphate est un exemple de produit neurotoxique couramment utilisé [n° CAS 78-30-8, n° EINECS 201-103-5, nomenclature CAS: acide phosphorique, tris(2-méthylphényl)es-ter]; il est également connu sous le nom de *tns-o*-crésylphosphate.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée oralement, en une prise unique, à des poules domestiques qui ont été protégées, le cas échéant, contre des effets cholinergiques aigus. Les animaux sont observés pendant 21 jours pour détecter des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après administration. 21 jours après l'exposition, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur des tissus nerveux choisis.

▼B

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Préparation**

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard en lots d'expérience et lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se mouvoir librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester est généralement administrée oralement, par gavage ou dans des capsules de gélatine, ou par une méthode comparable. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.5.2. **Conditions de l'essai**1.5.2.1. *Animaux d'expérience*

L'espèce recommandée est la poule pondeuse domestique adulte jeune âgée de 8-12 mois (*Gallus gallus domesticus*). Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se mouvoir librement.

1.5.2.2. *Nombre et sexe*

Outre le lot d'expérience, il faut prévoir un lot témoin recevant le véhicule seul et un lot témoin positif. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les déterminations biochimiques (trois à chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation de 21 jours.

Le lot témoin positif peut être réalisé en parallèle ou provenir d'expériences antérieures récentes. Il doit se composer d'au moins six poules traitées par un produit neurotoxique connu à effet retardé; trois poules seront réservées aux examens biochimiques et trois à la recherche de signes pathologiques. La mise à jour périodique des données historiques recueillies antérieurement est recommandée. De nouveaux lots positifs devront être réalisés si une des conditions essentielles de l'expérience (par exemple souches, alimentation, hébergement) a été modifiée par le laboratoire chargé de l'essai.

▼B1.5.2.3. *Niveau de doses*

Il convient d'effectuer une étude préliminaire sur un nombre approprié de poules réparties dans des lots traités à différentes doses, afin de déterminer la dose à utiliser pour l'étude principale. Un certain taux de mortalité est inévitable dans cette étude préliminaire. Toutefois, pour éviter la mort consécutive à des effets cholinergiques aigus, il est possible d'utiliser de l'atropine ou un autre agent protecteur ne perturbant pas la réaction neurotoxique différée. Diverses méthodes d'essai peuvent être utilisées pour évaluer la dose non létale maximale d'une substance (voir méthode B.1 *bis*). Les données recueillies antérieurement sur les poules ou d'autres informations toxicologiques peuvent également être utiles pour déterminer la dose.

La dose utilisée dans l'étude principale doit être aussi élevée que possible, compte tenu des résultats de l'étude préliminaire et de la limite supérieure de 2 000 mg/kg poids corporel. Quel que soit le taux de mortalité, il doit subsister un nombre suffisant d'animaux pour effectuer les analyses biochimiques (six) et l'examen histologique (six) au 21^e jour. Il convient d'utiliser de l'atropine ou un autre agent qui ne perturbe pas les réactions neurotoxiques différées, afin d'éviter la mort par effets cholinergiques aigus.

1.5.2.4. *Essai limite*

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 2 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure voisine ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.5.2.5. *Période d'observation*

La période d'observation doit s'étendre sur 21 jours.

1.5.3. **Mode opératoire**

Après administration d'un agent protecteur pour éviter que des effets cholinergiques aigus n'entraînent la mort, la substance à tester est administrée en une prise unique.

1.5.3.1. *Observation générale*

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées soigneusement plusieurs fois au cours des deux premiers jours, puis au moins une fois par jour, pendant 21 jours ou jusqu'à la date prévue du sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être notés, ainsi que la date d'apparition des troubles du comportement, leur type, leur gravité et leur durée. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être notée. Au moins deux fois par semaine, les poules destinées à la recherche des signes pathologiques doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles par exemple, afin de faciliter l'observation de faibles manifestations de toxicité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

▼B1.5.3.2. *Poids corporel*

Toutes les poules sont pesées juste avant l'administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.5.3.3. *Biochimie*

Six poules choisies au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins négatifs, ainsi que trois poules prélevées dans le lot témoin positif (si l'essai est réalisé en parallèle sur ce dernier) sont sacrifiées quelques jours après administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies. Il peut en outre s'avérer utile d'analyser l'inhibition de cette estérase sur du nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées après 24 heures et trois autres après 48 heures, tandis que les trois poules du lot témoin positif sont sacrifiées après 24 heures. Si l'observation des signes cliniques d'intoxication (souvent estimés par le moment d'apparition des effets cholinergiques) indique que la substance toxique est éliminée très lentement, il peut s'avérer préférable de prélever les tissus sur trois poules à deux autres temps compris entre 24 heures et au plus tard 72 heures après administration.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur des échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase *in vivo*, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

1.5.3.4. *Autopsie*

L'autopsie de tous les animaux (sacrifices prévus ou exigés par l'état de l'animal) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.5.3.5. *Examen histopathologique*

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés *in situ* par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région lombo-sacrée. Des coupes devront également être réalisées dans la partie distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles gastrocnémiens, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones.

2. **RÉSULTATS**

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents points d'évaluation retenus (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est normalement pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être présentés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou troubles, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou trouble aux différents niveaux de gravité.

▼B

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes statistiques appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. **COMPTE RENDU****PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- souche utilisée,
- nombre d'animaux et âge,
- origine, conditions d'hébergement, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'expérience.

Conditions expérimentales:

- détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,
- justification du choix du véhicule,
- détails concernant l'administration de la substance à tester,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,
- identité de l'agent protecteur éventuel et détails concernant son administration.

Résultats:

- données relatives au poids corporel,
- données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,
- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

*Discussion des résultats**Conclusion*4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 418 de l'OCDE.

▼B**B.38 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS****1. MÉTHODE****1.1. INTRODUCTION**

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'études in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Cet essai de neurotoxicité retardée sur 28 jours fournit des informations sur d'éventuels dangers pour la santé pouvant découler d'expositions répétées au cours d'une période déterminée. Il donnera des informations sur la relation dose-effet et pourra fournir une estimation du niveau de dose sans effet néfaste observé, pouvant être utile à l'établissement des critères de sécurité pour l'exposition.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase — NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à des poules domestiques pendant 28 jours. Les animaux sont observés au moins une fois par jour pour rechercher des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie, et ce jusqu'au 14^e jour après administration de la dernière dose. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après la dernière administration. Deux semaines après la dernière administration, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur certains tissus nerveux.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparation**

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard entre les lots d'expérience et les lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se déplacer librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester doit être administrée par voie orale chaque jour, sept jours sur sept, de préférence par gavage ou dans des capsules de gélatine. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.4.2. **Conditions de l'essai**1.4.2.1. *Animaux d'expérience*

Il est recommandé d'utiliser de jeunes poules pondeuses adultes (*Gallus quitus domesticus*) âgées de 8 à 12 mois. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se déplacer librement.

1.4.2.2. *Nombre et sexe*

En règle générale, il faut prévoir au moins trois lots d'expérience et un lot témoin recevant uniquement le véhicule. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les analyses biochimiques (trois lors de chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation post-traitement de 14 jours.

1.4.2.3. *Doses*

Les doses doivent être sélectionnées en tenant compte des résultats d'un essai de neurotoxicité retardée après exposition aiguë et de toute autre information disponible concernant la toxicité ou la cinétique de la substance à tester. La dose la plus élevée doit être choisie dans le but de produire des effets toxiques et de préférence une neurotoxicité différée, sans entraîner la mort ni des souffrances manifestes. Il convient ensuite de définir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une dose minimale n'entraînant aucun effet observable.

▼B1.4.2.4. *Essai limite*

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure apparentée ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.4.2.5. *Période d'observation*

Tous les animaux doivent être observés au moins une fois par jour pendant la période d'exposition et pendant les 14 jours suivants, sauf si une autopsie est prévue.

1.4.3. **Mode opératoire**

La substance à tester est administrée tous les jours, sept jours sur sept, pendant 28 jours.

1.4.3.1. *Observation générale*

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées attentivement au moins une fois par jour pendant les 28 jours de traitement et pendant les 14 jours suivants ou jusqu'à la date prévue de leur sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être consignés, ainsi que leur date d'apparition, leur type, leur gravité et leur durée. L'observation doit porter sur les troubles du comportement, sans toutefois s'y limiter. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinaire comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être consignée. Au moins deux fois par semaine, les poules doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles, par exemple, afin de faciliter l'observation des effets toxiques minimaux. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

1.4.3.2. *Poids corporel*

Toutes les poules sont pesées juste avant la première administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.4.3.3. *Biochimie*

Six poules prélevées au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins recevant le véhicule seul sont sacrifiées quelques jours après la dernière administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies (NTE). Il peut en outre s'avérer utile de rechercher l'inhibition de cette estérase sur le nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées 24 heures après la dernière administration et trois autres 24 heures plus tard, soit 48 heures après la dernière administration; si les résultats de l'étude par exposition aiguë ou d'autres études (étude toxicocinétique, par exemple) indiquent qu'il est préférable de choisir d'autres temps de sacrifice, les temps de sacrifices seront modifiés en conséquence et les documents justificatifs seront fournis.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur ces échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

▼B1.4.3.4. *Autopsie*

L'autopsie de tous les animaux (sacrifice programmé ou imposé par l'état des animaux) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.4.3.5. *Examen histopathologique*

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région sacro-lombaire. Des coupes devront également être réalisées dans la région distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles jumeaux du triceps, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones. Dans un premier temps, l'examen microscopique sera effectué sur les tissus conservés de tous les animaux du lot traité à la dose la plus élevée et du lot témoin. Si des effets sont mis en évidence dans le lot traité à la dose la plus élevée, l'examen microscopique devra également porter sur les tissus des animaux des lots traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

2. **RÉSULTATS**

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents critères d'évaluation retenus dans cette méthode (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou symptômes, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou symptôme aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. **COMPTE RENDU****PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- souche utilisée,
- nombre d'animaux et âge,
- origine, conditions d'hébergement, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'expérience.

▼B*Conditions expérimentales:*

- détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,
- justification du choix du véhicule,
- détails concernant l'administration de la substance à tester,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,
- si les déterminations biochimiques ne sont pas pratiquées 24 et 48 heures après la dernière administration, justification du choix d'autres temps.

Résultats:

- données relatives au poids corporel,
- données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,
- niveau de dose sans effet néfaste observé,
- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

*Discussion des résultats**Conclusion***4. RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 419 de l'OCDE.

▼B**B.39. ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE****1. MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 486, Essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules hépatiques de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (unscheduled DNA synthesis, UDS) sur cellules hépatiques de mammifère est destiné à identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN dans les cellules hépatiques des animaux traités (1, 2, 3, 4).

Cet essai in vivo constitue une méthode d'étude des effets génotoxiques des substances chimiques dans le foie. L'effet mesuré témoigne de l'altération de l'ADN et de la réparation qui en résulte dans les cellules hépatiques. Comme le foie est généralement le principal site du métabolisme des substances absorbées, il constitue un site approprié pour la détermination in vivo des altérations de l'ADN.

Il ne faut pas avoir recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

La synthèse non programmée de l'ADN (UDS) est mesurée en déterminant l'incorporation de nucléosides marqués dans les cellules qui ne subissent pas une synthèse programmée (phase S) de l'ADN. La technique la plus couramment utilisée est la détermination par autoradiographie de l'incorporation de thymidine marquée au tritium (³H-TdR). On utilise de préférence le foie de rat pour les essais UDS *in vivo*. D'autres tissus peuvent être utilisés mais ne font pas l'objet de cette méthode.

La détection d'une UDS dépend du nombre de bases d'ADN excisées et remplacées au site de l'altération. Ainsi, l'essai UDS est particulièrement utile pour détecter la réparation de longues séquences (20-30 bases) induite par la substance. Par contre, la réparation de courtes séquences (1-3 bases) est détectée avec une sensibilité beaucoup plus faible. En outre, des événements mutagènes peuvent résulter d'une non-réparation, d'une réparation erronée d'altérations de l'ADN ou d'une répllication erronée. L'ampleur de l'UDS ne fournit aucune indication quant à la fidélité du processus de réparation. D'autre part, il est possible qu'un mutagène réagisse avec l'ADN sans que l'altération de celui-ci soit réparée par un processus de réparation par excision. Le fait que l'essai UDS ne fournit pas d'informations spécifiques sur l'activité mutagène est compensé par la sensibilité potentielle de ce critère parce qu'il est mesuré dans la totalité du génome.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Cellules en réparation: nombre net de grains (NNG) supérieur à une valeur préétablie à justifier par le laboratoire effectuant l'essai.

Nombre net de grains (NNG): mesure quantitative de l'activité UDS de cellules lors d'essais UDS autoradiographiques; calculé en soustrayant du nombre de grains nucléaires (GN) le nombre moyen de grains cytoplasmiques dans des zones cytoplasmiques équivalentes au noyau (GC): $NNG = GN - GC$. Les NNG sont calculés pour les cellules individuelles, puis regroupés pour les cellules d'une culture, de cultures parallèles, etc.

▼B

Synthèse réparatrice de l'ADN (UDS): synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région lésée par des substances chimiques ou physiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique une synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région altérée par des substances chimiques ou physiques. L'essai repose généralement sur l'incorporation de ³H-TdR dans l'ADN de cellules hépatiques qui présentent une faible fréquence de cellules dans la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de ³H-TdR est généralement déterminée par autoradiographie dans la mesure où cette technique n'est pas sensible aux interférences dues aux cellules en phase S comme c'est le cas du comptage en scintillation liquide, par exemple.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**1.4.1. Préparations****1.4.1.1. Sélection de l'espèce animale**

Le rat est communément utilisé, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. Conditions d'encagement et régime alimentaire

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. Préparation des animaux

De jeunes adultes sains sont répartis par randomisation entre les groupes des animaux témoins et traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Ils sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.1.4. Substance d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les domaines du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales**1.4.2.1. Solvant/véhicule**

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux, chaque fois que cela est possible.

▼B1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) doivent être inclus dans chaque partie indépendante de l'expérience. Les animaux des groupes témoins sont traités exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent être *des* substances dont on sait qu'elles produisent une UDS à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les témoins positifs pour lesquels une activation métabolique est nécessaire doivent être utilisés à des doses qui donnent lieu à une réponse modérée (4). Les doses peuvent être choisies de façon que les effets soient évidents et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Moment de prélèvement	Substance	N° CAS	N° Einesc
Précoce (2-4 heures)	N-nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-249-8
Tardif (12-16 heures)	N-2-fluorénylacétamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. Le témoin positif doit être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Il convient d'utiliser un nombre adéquat d'animaux afin de tenir compte de variations interindividuelles de la réponse à l'essai. Il doit y avoir au moins 3 animaux analysables par groupe. Lorsqu'on dispose d'une importante quantité de données historiques, les groupes témoins négatifs et positifs peuvent ne comprendre que 1 ou 2 animaux.

Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre sexes, on peut effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, de préférence des mâles. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. **Modalité de traitement**

Les substances d'essai sont généralement administrées en une seule fois.

1.5.3. **Niveaux de dose**

Normalement, on utilise au moins deux niveaux de dose. La dose la plus élevée est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant les mêmes modalités, seraient létales. En général, la dose la plus faible est comprise entre la moitié et le quart de la dose la plus forte.

▼B

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception à ces critères d'établissement de doses et doivent être évaluées cas par cas. Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale.

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans le foie (noyaux pyénotiques, par exemple).

1.5.4. Test limite

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. Voies d'administration

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique *ou d'une* canule d'intubation adaptée. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. La voie péritonéale n'est toutefois pas recommandée, étant donné qu'elle peut conduire à une exposition directe du foie à la substance d'essai plutôt que par l'intermédiaire du système circulatoire. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. Préparation des cellules hépatiques

Les cellules hépatiques des animaux traités sont normalement préparées 12-16 heures après le traitement. Un prélèvement supplémentaire effectué plus tôt (normalement 2-4 heures après le traitement) est en général nécessaire, à moins qu'il y ait une réponse manifestement positive après 12-16 heures. Toutefois, d'autres délais de prélèvement peuvent être utilisés s'ils sont justifiés sur la base de données toxicocinétiques.

Les cultures à court terme de cellules hépatiques de mammifère sont habituellement établies en perfusant le foie *in situ* avec la collagénase et en laissant les cellules fraîchement dissociées se fixer sur une surface appropriée. Les cellules hépatiques des témoins négatifs doivent présenter une viabilité (5) d'au moins 50 pour cent.

1.5.7. Détermination de l'UDS

Les cellules hépatiques de mammifère fraîchement isolées sont généralement incubées dans un milieu contenant du ³H-TdR pendant une durée appropriée (3-8 heures, par exemple). A la fin de la période d'incubation, le milieu est enlevé des cellules, qui peuvent ensuite être incubées avec un milieu contenant un excès de thymidine non marquée, afin de réduire la radioactivité non incorporée (*cold chase*). Les cellules sont ensuite rincées, fixées et séchées. Pour les périodes d'incubation plus longues, la *cold chase* n'est pas absolument nécessaire. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique, maintenues dans l'obscurité (réfrigérées pendant 7-14 jours, par exemple), développées et colorées. On procède ensuite au comptage des grains d'argent. On prépare deux à trois lames pour chaque animal.

▼B**1.5.8. Analyse**

Les préparations sur lame doivent contenir un nombre suffisant de cellules de morphologie normale pour qu'une évaluation probante de l'UDS soit possible. Les préparations sont examinées au microscope en vue de la recherche de signes de cytotoxicité manifeste (pycnose, diminution du niveau de marquage radioactif, par exemple).

Les lames doivent être codées avant le comptage des grains. On analyse normalement 100 cellules de chaque animal sur au moins deux lames; l'analyse d'un nombre inférieur à 100 cellules/animal doit être justifié. Le nombre de grains n'est pas déterminé pour les noyaux en phase S, mais la proportion de cellules en phase S peut être enregistrée.

Le niveau d'incorporation de ^3H -TdR dans le noyau et le cytoplasme des cellules morphologiquement normales, tel qu'il est mis en évidence par le dépôt de grains d'argent, doit être déterminé à l'aide de méthodes appropriées.

Le nombre de grains est déterminé au niveau du noyau (grains nucléaires, GN) et des zones du cytoplasme équivalentes au noyau (grains cytoplasmiques, GC). Le nombre de GC est déterminé sur la base soit de la région du cytoplasme la plus fortement marquée, soit de la moyenne de deux ou trois régions proches du noyau choisies au hasard. D'autres méthodes de comptage (cellules entières, par exemple) peuvent être utilisées si on peut les justifier (6).

2. RÉSULTATS**2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux. Le nombre net de grains (NNG) doit être déterminé pour chaque cellule, chaque animal, chaque dose et chaque temps de prélèvement en soustrayant le nombre de GC du nombre de GN. Si des «cellules en réparation» sont comptées, les critères pour définir les «cellules en réparation» doivent être justifiés et se fonder sur des données historiques ou sur des témoins négatifs concomitants. Les résultats numériques peuvent être évalués à l'aide de méthodes statistiques. Dans ce cas, il faut choisir et justifier les tests statistiques avant la réalisation de l'étude.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemples de critères permettant de conclure à une réponse positive ou négative:

- | | |
|----------|---|
| positive | <ul style="list-style-type: none"> i) valeur NNG supérieure à un seuil préétabli justifié sur la base des données historiques du laboratoire, ou ii) valeur NNG significativement supérieure à celle du témoin concomitant, |
| négative | <ul style="list-style-type: none"> i) valeur NNG inférieure ou égale au seuil des contrôles historiques, ou ii) valeur NNG non significativement supérieure à celle du témoin concomitant. |

▼B

Il convient de prendre en considération la pertinence biologique des données (paramètres tels que la variation interindividuelle, la relation dose-réponse et la cytotoxicité). L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Un résultat positif à l'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique que la substance d'essai induit des altérations de l'ADN dans les cellules hépatiques de mammifère in vivo qui peuvent être réparées par la synthèse non programmée de l'ADN in vitro. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'altération de l'ADN détectable par cet essai.

Le fait que la substance d'essai atteigne la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3. RAPPORT**RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix de la voie d'administration,
- méthodes pour vérifier que la substance a atteint la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,

▼B

- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,
- description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- méthode de préparation et de culture des cellules hépatiques,
- technique autoradiographique utilisée,
- nombre de lames préparées et nombre de cellules analysées,
- critères d'évaluation,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

- valeurs moyennes du nombre de grains nucléaires, du nombre de grains cytoplasmiques et du nombre net de grains pour chaque lame, animal et groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- évaluation statistique, le cas échéant,
- signes de toxicité,
- données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,
- données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- nombre de «cellules en réparation», s'il a été déterminé,
- nombre de cellules en phase S, s'il a été déterminé,
- viabilité des cellules.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1 — 18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123 — 133.
- (3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M, (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52 — 77.

▼B

- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutations Res.*, 312, pp. 263 — 285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.* 291. pp. 21 — 27.
- (6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte HNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553 — 562.

▼B**B.40. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI DE RESISTANCE ÉLECTRIQUE TRANSCUTANÉE (RET)****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 430 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau après l'application d'un matériel d'essai [selon la définition du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)] (1). La présente méthode propose une évaluation de la corrosivité qui n'est pas réalisée sur des animaux vivants.

Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée impliquait le recours à des animaux de laboratoire (2). Dans le souci d'éviter les douleurs et les souffrances ainsi infligées aux animaux, la méthode d'essai B.4 a été révisée afin de permettre la détermination de la corrosion cutanée par la mise en œuvre de méthodes de substitution in vitro.

La conduite d'études de pré-validation a néanmoins été une première étape dans la définition d'essais de substitution susceptibles d'être utilisés pour des essais de corrosivité cutanée menés à des fins réglementaires (3). Par la suite, une étude formelle de validation des méthodes in vitro d'évaluation de la corrosion cutanée (4) (5) a été conduite (6) (7) (8). Sur la base des résultats de ces études et d'autres publications, il est maintenant recommandé d'évaluer la corrosivité cutanée in vivo à l'aide des essais suivants (9) (10) (11): l'essai utilisant un modèle de peau humaine (voir méthode d'essai B.40 *bis*) et l'essai de résistance électrique transcutanée (la présente méthode).

Selon une étude de validation et d'autres études publiées, l'essai de résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat (12) (13) permet de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau (5) (9).

L'essai décrit dans cette méthode permet d'identifier les substances et mélanges chimiques corrosifs. Appuyé par d'autres éléments de détermination fondés sur d'autres informations existantes (pH, relations structure-activité, données humaines et/ou animales, par exemple), il permet également d'identifier les substances et mélanges non corrosifs (1) (2) (11) (14). En revanche, il ne fournit pas d'information sur l'irritation cutanée, et contrairement au système général harmonisé de classification (SGH) (1), il ne permet pas non plus la sous-catégorisation des substances corrosives.

Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de suivre la démarche expérimentale séquentielle présentée en supplément à la méthode d'essai B.4(2) et proposée dans le système général harmonisé (1). Cette démarche expérimentale prévoit la conduite d'essais in vitro de corrosion cutanée (tel que celui décrit dans la présente méthode) et d'irritation cutanées avant d'envisager des essais sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Corrosion cutanée in vivo: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions douteuses.

Résistance électrique transcutanée (RET): mesure de l'impédance électrique de la peau, exprimée par une valeur de résistance en kilo-Ohms. Il s'agit d'une méthode simple et fiable permettant d'évaluer la fonction de barrière de la peau, par l'enregistrement du passage des ions à travers la peau à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Tableau 1

Substances chimiques de référence

Nom	N° EINECS	N° CAS	
Diamino-1,2 propane	201-155-9	78-90-0	Gravement corrosif
Acide acrylique	201-177-9	79-10-7	Gravement corrosif
O-tert. Butylphénol	201-807-2	88-18-6	Corrosif
Hydroxyde de potassium (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosif
Acide sulfurique (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosif
Acide octanoïque (acide caprylique)	204-677-5	124-07-02	Corrosif
4-amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Non corrosif
Eugénol	202-589-1	97-53-0	Non corrosif
Bromure de phénylène	203-130-8	103-63-9	Non corrosif
Perchloroéthylène	204-825-9	27-18-4	Non corrosif
Acide isostéarique	250-178-0	30399-84-9	Non corrosif
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	222-365-7	3446-89-7	Non corrosif

La plupart des substances chimiques données ici proviennent de la liste des substances chimiques sélectionnées par le CEVMA dans son étude de validation internationale (4). Les choix du CEVMA sont fondés sur les critères suivants:

- i) nombre égal de substances corrosives et non corrosives;

▼B

- ii) substances disponibles dans le commerce et couvrant la plupart des classes chimiques pertinentes;
- iii) insertion de substances extrêmement corrosives et moins corrosives, de façon à permettre une distinction basée sur le pouvoir de corrosion;
- iv) substances chimiques manipulables en laboratoire sans présenter d'autres risques majeurs que la corrosivité.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le matériel d'essai est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau, placés dans un système d'essai à deux compartiments pour lequel les disques de peau font office de séparation entre les compartiments. Ces disques cutanés sont prélevés sur la peau de jeunes rats âgés de 28 à 30 jours et humanement euthanasiés. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du stratum corneum normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET en deçà d'une valeur seuil (12). Dans le cas des rats, une valeur de seuil de la RET de 5 k Ω . a été retenue, sur la base de nombreuses données relatives à un large éventail de substances chimiques, desquelles il ressortait que l'immense majorité des valeurs étaient soit très supérieures (souvent > 10 k Ω), soit très inférieures (souvent < 3 k Ω .) à cette valeur de seuil (12). De manière générale, les matériels non corrosifs sur les animaux, mais irritants ou non irritants, ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Par ailleurs, l'utilisation d'autres préparations de peau ou d'autres équipements est susceptible de modifier la valeur de seuil, ce qui impose de procéder à une validation supplémentaire.

Une étape de fixation d'un colorant est incorporée dans la procédure d'essai pour confirmer les résultats positifs de la RET présentant des valeurs autour de 5 k Ω . Cette étape de fixation d'un colorant détermine en effet si l'accroissement de la perméabilité ionique est imputable à la destruction physique du stratum corneum. Dans la pratique, la méthode de l'essai RET sur peau de rat prédit très bien la corrosivité in vivo chez le lapin évaluée par la méthode d'essai B.4 (2). A cet égard, il convient de noter que l'essai in vivo sur des lapins est extrêmement prudent concernant la corrosivité et l'irritation cutanées par rapport à l'essai sur modèle de peau humaine (15).

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. Animaux

Les rats sont l'espèce la mieux adaptée pour cet essai dans la mesure où la sensibilité de leur peau aux substances chimiques employées a déjà été démontrée (10). L'âge (au moment du prélèvement de la peau) et la souche utilisée sont des critères déterminants, puisqu'il est essentiel que les follicules pileux soient en phase dormante avant le début de la pousse de la fourrure adulte.

▼B

Les poils du dos et des flancs des jeunes rats (Wistar ou souche comparable) mâles ou femelles, âgés approximativement de 22 jours, sont soigneusement coupés à l'aide d'une petite tondeuse. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tonduée étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième ou le quatrième jours après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours, lorsque le stratum corneum a récupéré de la tonte.

1.5.2. Préparation des disques cutanés

Les animaux, âgés de 28 à 30 jours (cet âge est particulièrement important) sont euthanasiés de façon humaine. On prélève la peau dorso-latérale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. Des disques cutanés, d'un diamètre approximatif de 20 mm chacun sont prélevés. La peau peut être stockée avant d'utiliser les disques lorsqu'il est établi que les données de contrôle positives et négatives sont équivalentes à celles obtenues avec de la peau fraîche.

Chaque disque cutané est placé sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir ajusté de force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la Figure 2. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé à l'extrémité du tube PTFE de manière étanche à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (Figure 1). Le disque cutané doit être complètement immergé dans la solution de sulfate de magnésium ($MgSO_4$). Entre 10 et 15 disques cutanés peuvent être prélevés de la peau d'un rat.

Avant le début de l'essai, on mesure, pour chaque peau de rat, la résistance électrique de deux disques cutanés, à titre de contrôle de la qualité. Pour que les autres disques d'une même peau soit valables pour l'essai, il faut que les deux disques donnent des valeurs de résistance supérieures à 10 k Ω . Si la résistance est inférieure à 10 k Ω , les disques restants provenant de la même peau doivent être éliminés.

1.5.3. Application des substances d'essai et de contrôle

Pour chaque étude, des substances de contrôle positif et négatif doivent être utilisées parallèlement à la substance d'essai, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Dans ce contexte, les disques cutanés employés doivent provenir d'un même animal. Les substances de contrôle positif et négatif recommandées sont respectivement l'acide hydrochlorique 10 M et l'eau distillée.

Les substances d'essai liquides (150 μ l) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube. Pour l'essai de substances solides, une quantité suffisante du solide est appliquée uniformément sur le disque de peau, de façon à ce que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 μ l) sur les solides, on agite le tube doucement. Afin d'optimiser le contact avec la peau, certains solides doivent être chauffés à 30 °C pour dissoudre la substance d'essai ou être broyés pour obtenir des grains ou une poudre.

▼B

On utilise trois disques cutanés pour chaque substance d'essai. Ces substances sont appliquées pendant 24 heures à une température de 20 à 23 °C, puis éliminées complètement par lavage sous l'eau du robinet à 30 °C maximum.

1.5.4. Mesures de la RET

L'impédance de la peau, c'est-à-dire la RET, est mesurée à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone en courant alternatif basse tension (13), présentant les caractéristiques suivantes: tension de 1 à 3 Volts, courant alternatif de forme sinusoïdale ou rectangulaire compris entre 50 et 1000 Hz, et une plage de mesure au moins comprise entre 0,1 et 30 k Ω . Le pont de mesure utilisé dans l'étude de validation permettait de mesurer l'inductance, la capacitance et la résistance jusqu'à des valeurs de 2 000 H, 2 000 μ F et 2 M respectivement, à des fréquences de 100 Hz ou 1 kHz, en utilisant des valeurs en parallèle ou en série. Pour les besoins de l'essai RET de corrosivité, les mesures sont enregistrées en résistance, à une fréquence de 100 Hz et à l'aide de valeurs en série. Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol du tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en k Ω /disque cutané (Figure 1). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode en dessous des pinces crocodiles sont indiquées dans la Figure 2. La pince maintenant l'électrode intérieure repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure est introduite dans le compartiment receveur de telle manière qu'elle repose sur le fond de celui-ci. La distance entre la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (Figure 2), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue. Par conséquent, la distance entre l'électrode intérieure et le disque cutané doit être constante et minimale (1 à 2 mm).

Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 k Ω , ceci peut être dû au fait que des restes de la substance d'essai couvrent la surface épidermique du disque de peau. On peut essayer de retirer davantage de substance d'essai, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ. On élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

Les caractéristiques et dimensions de l'appareil d'essai et de la procédure expérimentale peuvent avoir une incidence sur les valeurs de RET obtenues. Le seuil de corrosivité de 5 k Ω a été défini sur la base des données obtenues à partir de l'appareil et de la procédure spécifiques décrits dans cette méthode. Avec un autre équipement ou dans des conditions d'essai différentes, les valeurs de seuil et de contrôle peuvent être différentes. Par conséquent, il est nécessaire d'étalonner la méthodologie et la valeur de seuil de résistance en testant différentes substances de référence étalons, choisies parmi celles utilisées dans l'étude de validation (4) (5), ou dans des classes chimiques équivalentes à celles des substances étudiées. Le Tableau 1 présente un ensemble de substances de référence qui conviennent.

▼B**1.5.5. Méthodes avec fixation d'un colorant**

L'exposition à certains matériels non corrosifs peut entraîner une réduction de la résistance sous la valeur de seuil de 5 k Ω , permettant ainsi le passage d'ions à travers le stratum corneum, ce qui réduit ainsi la résistance électrique (5). Par exemple, les substances organiques neutres et les substances tensio-actives (détergents, émulsifiants et autres agents de surface) peuvent évacuer les lipides de la peau et accroître la perméabilité aux ions de la barrière cutanée. Par conséquent, si les valeurs de RET des substances d'essai sont inférieures à, ou proches de, 5 k Ω , en l'absence de toute lésion visible, une étude de pénétration d'un colorant doit être menée sur les tissus traités et de contrôle, afin de déterminer si ces valeurs de RET résultent d'une perméabilité accrue ou d'une corrosion de la peau (3) (5). S'il s'agit d'une corrosion, autrement dit si le stratum corneum est rompu, le colorant sulforhodamine B appliqué à la surface de la peau pénètre rapidement et teinte les tissus sous-jacents. Ce colorant reste stable au contact d'un large éventail de substances chimiques et n'est pas affecté par la procédure d'extraction décrite ci-après.

1.5.5.1. Application et élimination du colorant Sulforhodamine B

Après l'essai de RET, le sulfate de magnésium est évacué du tube et la peau est soigneusement examinée. Si aucune lésion majeure n'est visible, 150 μ l d'une dilution à 10 pour cent (p/v) de sulforhodamine B (Acid Red 52; CI. 45100; numéro EINECS 222-529-8; numéro CAS 3520-42-1) dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque cutané pendant 2 heures. Les disques cutanés sont lavés ensuite sous un jet d'eau courante à la température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire ou non fixé. Chaque disque cutané est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire ou non fixé. Après avoir répété l'opération de rinçage, on enlève les disques cutanés et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 pour cent (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C.

Après incubation, chaque disque de peau est enlevé et jeté et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 21 °C (force centrifuge relative \sim 175 x g). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 pour cent (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

1.5.5.2. Calcul de la teneur en colorant

La teneur de chaque disque en colorant sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (5) (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 565 nm = $8,7 \times 10^4$; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau à l'aide d'une courbe étalon appropriée et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés.

2. RÉSULTATS

Les valeurs de résistance (k Ω) et de teneur moyenne en colorant (μ g/disque), le cas échéant, pour le matériel d'essai et pour les contrôles positifs et négatifs doivent être présentées sous forme de tableau (données individuelles et moyennes \pm écart-type), y compris les données des essais répétés/répliqués, les valeurs moyennes et individuelles.

▼B

2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les fourchettes acceptables pour la méthode en laboratoire d'essai. Les fourchettes acceptables de valeur de résistance pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Plage de résistance (kΩ)
Positif	Acide hydrochlorique 10 M	0,5 – 1,0
Négatif	Eau distillée	10 – 25

Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la fourchette acceptable pour la méthode. Les fourchettes acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Plage de teneur en colorant (µg/disque)
Positif	Acide hydrochlorique 10 M	40 – 100
Négatif	Eau distillée	15 – 35

On considère que la substance d'essai est non corrosive pour la peau:

- i) si la valeur moyenne de la RET pour la substance d'essai est supérieure à 5 kΩ, ou
- ii) si la valeur moyenne de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ, et
 - que le disque cutané ne présente aucune lésion visible, et
 - que la teneur moyenne en colorant du disque est bien inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement.

On considère que la substance d'essai est corrosive pour la peau:

- i) si la valeur moyenne de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ et si le disque cutané est visiblement lésé, ou
- ii) si la valeur moyenne de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ, et
 - que le disque cutané ne présente aucune lésion visible, et
 - que la teneur moyenne en colorant du disque est bien inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement.

▼B**3. RAPPORT****3.1. RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substances d'essai et de contrôle:

- nom(s) chimique(s), tels que le nom IUPAC ou CAS, et le cas échéant le numéro CAS;
- pureté et composition de la substance ou de la préparation [en pourcentage(s) en poids] et état physique;
- propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, le pH, la stabilité, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;
- le cas échéant, traitement des substances d'essai et de contrôle avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);
- stabilité (si connue)

Animaux d'essai:

- souche et sexe
- âge au moment du prélèvement de peau
- source, conditions d'hébergement, alimentation, etc.
- détails de la préparation de la peau

Conditions d'essai:

- courbes d'étalonnage de l'appareil d'essai;
- courbes d'étalonnage des performances de l'essai de fixation d'un colorant;
- détails de la procédure d'essai utilisée pour les mesures de la RET;
- détails de la procédure d'essai utilisée pour l'évaluation de la fixation d'un colorant, le cas échéant;
- description de toute modification de la procédure d'essai description des critères d'évaluation utilisés.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des valeurs de RET et des résultats de l'essai de fixation d'un colorant (le cas échéant), pour chaque animal et chaque échantillon de peau
- description de tous les effets observés

Discussion des résultats

Conclusions

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, numéro 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).

▼B

- (2) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.
- (3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxic, in Vitro* 12, 471-482.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic, in Vitro* 12, 483- 524.
- (6) OCDE (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
- (7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. *ATLA* 23, 129-147.
- (8) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>
- (9) CEVMA (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26, 275-280.
- (10) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/episbrd.pdf>.
- (11) OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
- (12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An in vitro skin corrosivity test — modifications and validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.

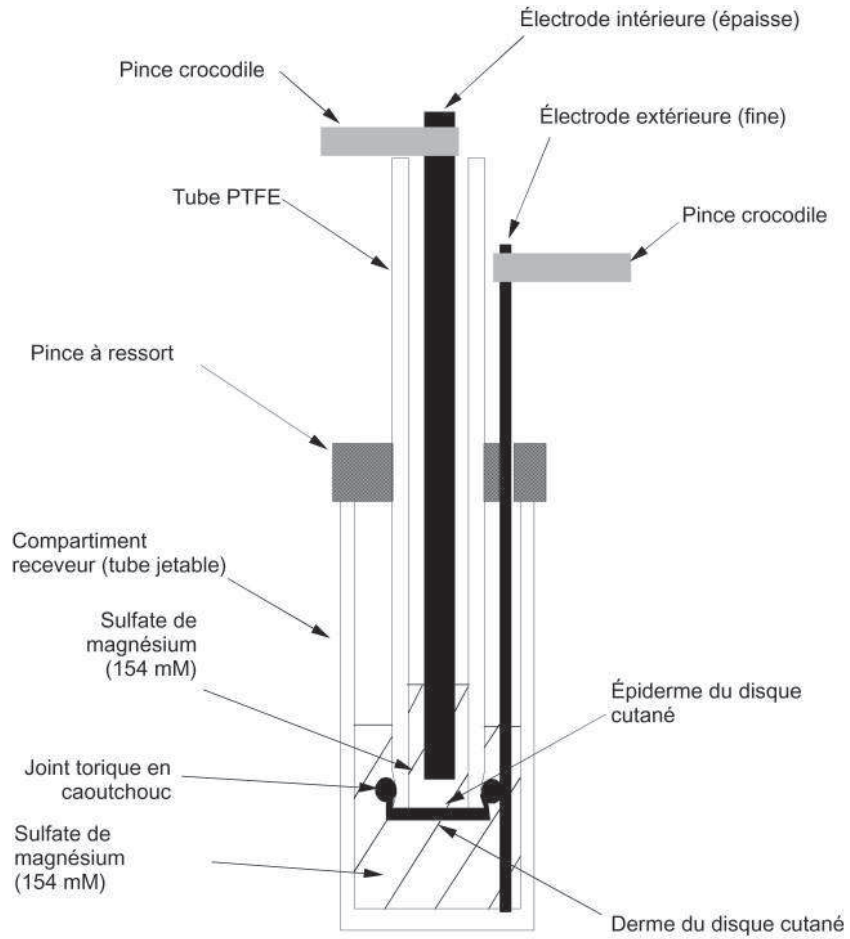
▼B

- (13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test in vitro: results of an inter-laboratory trial. *Toxic, in Vitro* 6, 191-194.
- (14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709-720.
- (15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 845-852.
- (16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. *Toxic, in Vitro.* 2, 7-17.

▼B

Figure 1

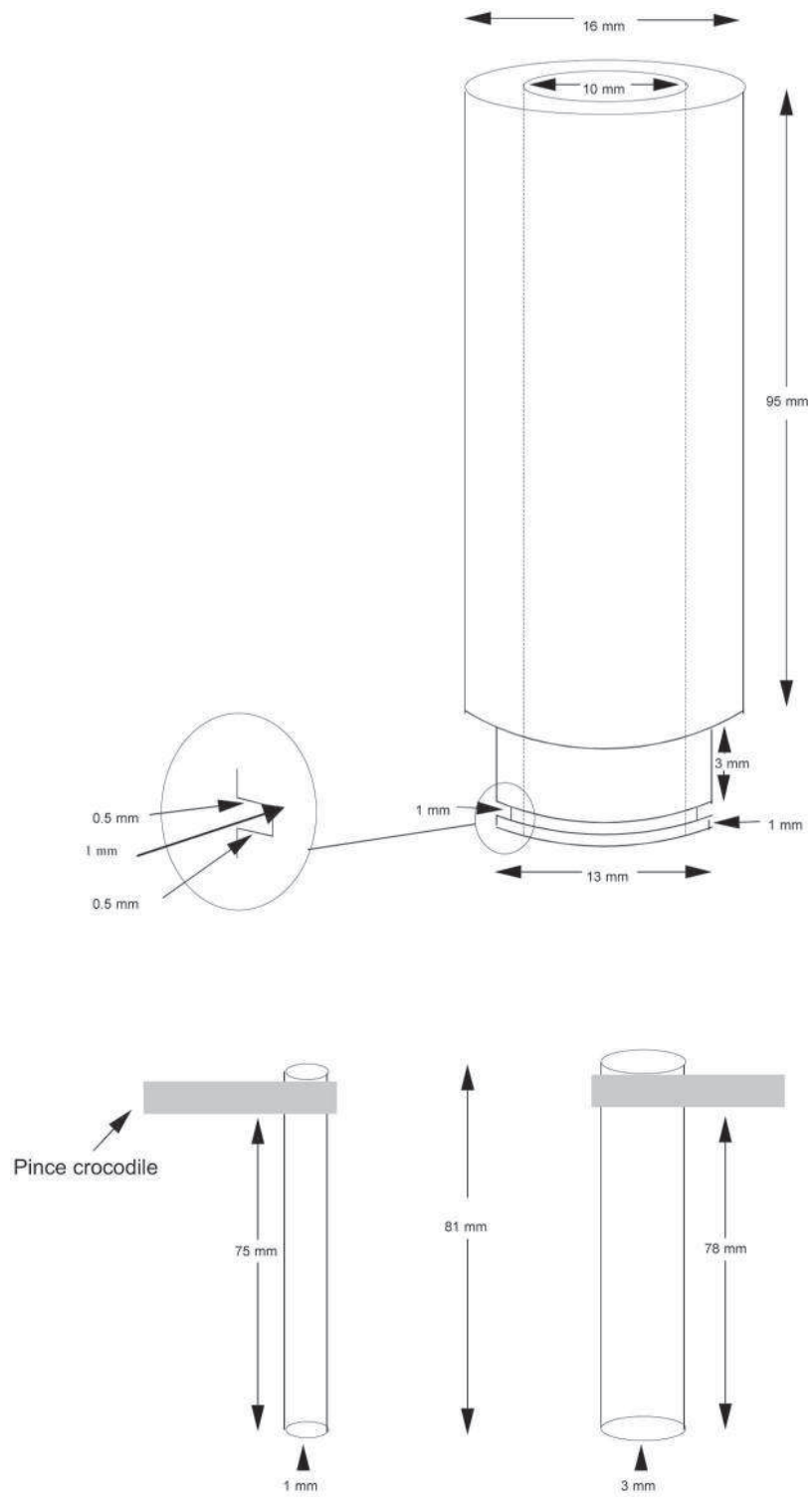
Appareil pour l'essai de RET sur peau de rat



▼B

Figure 2

Dimensions du tube PFTE (polytétrafluoroéthylène), des tubes receveurs et des électrodes utilisés



▼B**Facteurs importants pour l'appareil ci-dessus:**

- diamètre intérieur du tube PTFE,
- longueur des électrodes par rapport au tube PTFE et au tube receveur: le disque cutané ne doit pas être en contact avec les électrodes, et une longueur standard d'électrode doit être en contact avec la solution de sulfate de magnésium,
- quantité de solution de sulfate de magnésium dans le tube receveur: la profondeur de liquide, par rapport au niveau dans le tube PTFE, doit être telle qu'indiquée dans la figure 1,
- fixation du disque cutané sur le tube PTFE: la résistance électrique doit être véritablement une mesure des propriétés de la peau.

▼B**B.40 bis. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 431 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau après application d'un matériel d'essai [selon la définition du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)] (1). La présente méthode d'essai ne nécessite pas l'utilisation d'animaux vivants ou de tissus animaux pour l'évaluation la corrosivité cutanée.

Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée impliquait le recours à des animaux de laboratoire (2). Dans le souci d'éviter les douleurs et les souffrances ainsi infligées aux animaux, la méthode d'essai B.4 a été révisée afin de permettre la détermination de la corrosion cutanée par la mise en œuvre de méthodes de substitution in vitro.

La conduite d'études de pré-validation a néanmoins été une première étape dans la définition d'essais de substitution susceptibles d'être utilisés pour des essais de corrosivité cutanée menés à des fins réglementaires (3). Par la suite, une étude formelle de validation des méthodes in vitro d'évaluation de la corrosion cutanée (4)(5) a été conduite (6) (7) (8). Sur la base des résultats de ces études et d'autres publications (9), il est maintenant recommandé d'évaluer la corrosivité cutanée in vivo à l'aide des essais suivants (10) (11) (12) (13): l'essai sur modèle de peau humaine (la présente méthode) et l'essai de résistance électrique transcutanée (voir méthode d'essai B.40).

Selon les études de validation, les essais sur modèles de peau humaine (3)(4)(5)(9) permettent de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau. Le protocole d'essai peut aussi fournir des indications permettant de distinguer les substances extrêmement corrosives pour la peau de celles qui le sont moins.

L'essai décrit dans cette méthode permet d'identifier les substances et mélanges chimiques corrosifs. Appuyé par d'autres éléments de détermination fondés sur d'autres informations existantes (pH, relations structure-activité, données humaines et/ou animales, par exemple), il permet également d'identifier les substances et mélanges non corrosifs (1) (2) (13) (14). En revanche, il ne fournit pas d'information sur l'irritation cutanée, et contrairement au système général harmonisé de classification (SGH) (1), il ne permet pas non plus la sous-catégorisation des substances corrosives.

Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de suivre la démarche expérimentale séquentielle présentée en supplément à la méthode d'essai B.4 (2) et proposée dans le système général harmonisé (SGH) (1). Cette démarche expérimentale prévoit la conduite d'essais in vitro de corrosion cutanée (tel que celui décrit dans la présente méthode) et d'irritation cutanées avant d'envisager des essais sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Corrosion cutanée in vivo: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions douteuses.

Viabilité cellulaire: le paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT), qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Tableau 1

Substances chimiques de référence

Nom	N° EINECS	N° CAS	
Diamino-1,2 propane	201-155-9	78-90-0	Gravement corrosif
Acide acrylique	201-177-9	79-10-7	Gravement corrosif
O-tert. butylphénol	201-807-2	88-18-6	Corrosif
Hydroxyde de potassium (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosif
Acide sulfurique (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosif
Acide octanoïque (acide caprylique)	204-677-5	124-07-02	Corrosif
4-amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Non corrosif
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Non corrosif
Bromure de phénétyle	203-130-8	103-63-9	Non corrosif
Perchloroéthylène	204-825-9	27-18-4	Non corrosif
Acide isostéarique	250-178-0	30399-84-9	Non corrosif
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	222-365-7	3446-89-7	Non corrosif

La plupart des substances chimiques données ici proviennent de la liste des substances chimiques sélectionnées par le CEVMA dans son étude de validation internationale (4). Les choix du CEVMA sont fondés sur les critères suivants:

- (i) nombre égal de substances corrosives et non corrosives;
- (ii) substances disponibles dans le commerce et couvrant la plupart des classes chimiques pertinentes;
- (iii) insertion de substances extrêmement corrosives et moins corrosives, de façon à permettre une distinction sur la base du pouvoir de corrosion;

▼B

- (iv) substances chimiques manipulables en laboratoire sans présenter d'autres risques majeurs que la corrosivité.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai est généralement appliquée sur un modèle tridimensionnel de peau humaine, comprenant au moins un épiderme reconstitué avec un stratum corneum fonctionnel. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur aptitude à réduire la viabilité cellulaire [déterminée, par exemple, à l'aide de l'essai de réduction du MTT (15)] en dessous de valeurs seuils définies pour des périodes d'exposition déterminées. Le principe de l'essai sur modèle de peau humaine s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle les substances chimiques corrosives sont capables de pénétrer dans le stratum corneum par diffusion ou érosion, et sont suffisamment cytotoxiques pour les couches cellulaires sous-jacentes.

1.4.1. Procédure

1.4.1.1. *Modèles de peau humaine*

Les modèles de peau humaine peuvent être constitués pour l'étude, obtenus dans le commerce (par exemple, les modèles EpiDerm™ et EPISKIN™) (16) (17) (18) (19), ou encore mis au point et constitués dans le laboratoire d'essai (20) (21). Il est entendu que l'utilisation de la peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique admises d'ordre national et international. Tout nouveau modèle doit être validé (au moins dans la mesure indiquée au point 1.4.1.1.2). Les modèles de peau humaine utilisés pour cet essai doivent répondre aux conditions et critères suivants:

1.4.1.1.1 Conditions générales applicables au modèle:

L'épithélium doit être constitué à partir de kératinocytes humains. Le modèle doit avoir un stratum corneum fonctionnel avec plusieurs couches sous-jacente de cellules épithéliales vivantes, et comporter le cas échéant une couche stromale. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches, avec un profil lipidique suffisant pour assurer une fonction de barrière offrant une résistance à la pénétration rapide des marqueurs cytotoxiques. Par ailleurs, il est essentiel que le modèle présente des propriétés d'isolement afin que la substance d'essai ne puisse pas contourner le stratum corneum pour pénétrer dans les tissus vivants. En effet, une telle possibilité de contournement diminue la qualité de la modélisation de l'exposition de la peau. Enfin, le modèle de peau ne doit présenter aucune forme de contamination bactérienne (y compris par le mycoplasme) ou mycosique.

1.4.1.1.2 Conditions applicables au modèle fonctionnel:

L'amplitude de la viabilité cellulaire est généralement mesurée par le niveau MTT, ou autres colorants vitaux métaboliquement transformés. Dans ces cas, la densité optique (DO) du colorant (solubilisé) extrait du tissu de contrôle négatif doit être au moins 20 fois supérieure à la DO du solvant d'extraction seul [pour une présentation, voir la référence (22)]. Le tissu de contrôle négatif doit être stable en culture (c'est-à-dire qu'il doit présenter des mesures de viabilité comparables) pendant la durée de la période d'exposition. Le stratum corneum doit être suffisamment solide pour résister à la pénétration rapide de certains produits chimiques marqueurs cytotoxiques (par exemple, Triton X-100 à 1 %). Cette propriété peut être évaluée en fonction du temps d'exposition nécessaire pour réduire de moitié la viabilité cellulaire (TE_{50}) (par exemple, pour les modèles EpiDerm™ et EPISKIN™, cette période est > 2 heures). Par ailleurs, le tissu doit pouvoir être reproduit dans le temps et, de préférence, par différents laboratoires. Enfin, utilisé dans le protocole d'essai choisi, il doit permettre de prévoir le potentiel corrosif des substances chimiques de référence (voir le Tableau 1).

▼B1.4.1.2. *Application des substances d'essai et de contrôle*

Deux tissus (répliques) sont utilisées pour chaque traitement (c'est-à-dire chaque durée d'exposition), y compris les contrôles. Pour les substances liquides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir uniformément la surface cutanée (25 µl/cm² au minimum). Pour les substances solides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir régulièrement la peau et ensuite l'humidifier avec de l'eau désionisée ou distillée pour assurer un bon contact avec la peau; si nécessaire, les substances solides doivent être réduites en poudre avant leur application. La méthode d'application doit convenir à la substance chimique mise à l'essai (5). A la fin de la période d'exposition, la surface cutanée doit être nettoyée avec soin afin d'éliminer la substance d'essai à l'aide d'une solution tampon appropriée ou de NaCl à 0,9 pour cent.

Pour chaque étude, des contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés parallèlement à la substance d'essai, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Pour cet essai, les substances suggérées pour les contrôles positifs sont l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8 N, et pour les contrôles négatifs, l'eau ou une solution NaCl à 0,9 pour cent.

1.4.1.3. *Mesures de la viabilité cellulaire*

Seules les méthodes quantitatives, validées peuvent être utilisées pour mesurer la viabilité cellulaire. En outre, la mesure de la viabilité doit être compatible avec une application sur un tissu tridimensionnel. La fixation de colorant non spécifique ne doit pas interférer avec la mesure de la viabilité. Par conséquent, les colorants dont la fixation utilise une protéine et ceux qui ne passent pas par une conversion métabolique (par exemple, le rouge neutre) sont à proscrire. L'essai le plus fréquemment employé est l'essai de réduction du MTT [Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bleu de thiazole; numéro EINECS: 206-069-5, numéro CAS 298-93-1], qui donne des résultats précis et reproductibles (5), mais d'autres peuvent aussi être utilisés. L'échantillon de peau est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple, 0,3 - 1 mg/ml) à la température d'incubation voulue et pour une durée de 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (isopropanol), puis on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à une longueur d'onde comprise entre 540 et 595 nm.

L'action chimique de la substance d'essai sur le colorant vital est susceptible d'imiter celle du métabolisme cellulaire et, partant, de conduire à estimation erronée de la viabilité. Il a été montré que cela survient lorsque la substance d'essai n'est pas complètement éliminée par rinçage (9). Si la substance d'essai agit directement sur colorant vital, des contrôles supplémentaires doivent être pratiqués pour détecter et corriger les interférences de la substance avec la mesure de viabilité (9) (23).

2. **RÉSULTATS**

Pour chaque tissu, les valeurs de DO et les pourcentages calculés de viabilité cellulaire obtenus pour chaque substance d'essai, ainsi que pour les contrôles positifs et négatifs, sont présentés sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés, le cas échéant les valeurs moyennes et individuelles.

▼B

2.1. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La valeur de la DO du contrôle négatif représente une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 pour cent. Par conséquent, les valeurs de la DO obtenues pour chaque échantillon d'essai peuvent être utilisées pour calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire qui établit la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre différentes classes de substances corrosives), ou encore la ou les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les substances corrosives, doivent être clairement définies et documentées. De même, il doit être démontré qu'elles sont appropriées. De manière générale, ces valeurs de seuil sont établies au cours de la phase d'optimisation de l'essai, testées dans une phase de pré-validation, puis confirmées ensuite dans une étude de validation. A titre d'exemple, l'évaluation de la corrosivité associée au modèle EpiDerm™ est la suivante (9):

La substance d'essai est considérée comme étant corrosive pour la peau:

- (i) si la viabilité après 3 minutes d'exposition est inférieure à 50 pour cent, ou
- (ii) si la viabilité après 3 minutes d'exposition est supérieure ou égale à 50 pour cent, et la viabilité après une heure d'exposition inférieure à 15 pour cent.

La substance d'essai est considérée comme étant non corrosive pour la peau:

- (i) si la viabilité après 3 minutes d'exposition est supérieure ou égale à 50 pour cent, et la viabilité après une heure d'exposition supérieure ou égale à 15 pour cent.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substances d'essai et de contrôle:

- nom(s) chimique(s), tels que le nom IUPAC ou CAS, et le cas échéant le numéro CAS;
- pureté et composition de la substance ou la préparation (en pourcentage(s) en poids);
- propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, le pH, la stabilité, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;
- le cas échéant, traitement des substances d'essai et de contrôle avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);
- stabilité (si connue)

Justification du choix du modèle de peau et du protocole utilisé.

Conditions d'essai:

- système cellulaire utilisé
- information sur l'étalonnage du dispositif utilisé pour la mesure de la viabilité cellulaire (un spectrophotomètre, par exemple)

▼B

- information complète à l'appui du modèle spécifique de peau humaine, et notamment sa validité
- détails de la procédure d'essai utilisée
- doses d'essai utilisées
- description de toute modification éventuelle de la procédure d'essai
- référence aux données historiques du modèle
- description des critères d'évaluation utilisés

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai
- description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, numéro 33, ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001_doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001_doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).
- (2) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.
- (3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219-255.
- (4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471-482.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 12, 483-524.
- (6) OCDE (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
- (7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.
- (8) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.

▼B

- (9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C, Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C, Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. *ATLA* 28, pp. 371-401.
- (10) CEVMA (1998). *ECVAM News & Views*. *ATLA* 26, 275-280.
- (11) CEVMA (2000). *ECVAM News & Views*. *ATLA* 28, 365-67.
- (12) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/episjird.pdf>.
- (13) OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
- (14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709-720.
- (15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- (16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxic. In Vitro* 8, 889-891.
- (17) Ponc, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmaceutics*. 203, 211 -225.
- (18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In *In vitro Skin Toxicology*. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140
- (19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post — transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental Cell Research* 193: 310-319
- (20) Parentau, NX., Bilbo, P., Molte, C J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cyto-technology* 9, 163-171.
- (21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, NX. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnology and Bioengineering* 43/8. 747-756.

▼B

- (22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 5, 69- 84.
- (23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C, Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 15, 57-93.

▼B**B.41. ESSAI DE PHOTOTOXICITE IN VITRO 3T3 NRU****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 432 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La phototoxicité est définie comme un effet toxique dû à l'application d'une substance sur le corps, qui est soit déclenché ou accentué (et visible à des niveaux de dose faibles) après une exposition ultérieure à la lumière, soit provoqué par l'irradiation de la peau après administration d'une substance par voie systémique.

Le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU permet de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai induit par l'excitation du produit chimique après exposition à la lumière. Cet essai évalue la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit chimique, en présence ou en l'absence de lumière. Les substances identifiées par cet essai sont susceptibles d'être phototoxiques in vivo après administration systémique et diffusion dans la peau, ou après application topique.

Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (1) (2) (3) (4). Le point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans la plage de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grothaus-Draper), la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester suivant la ligne directrice 101 de l'OCDE. Si le coefficient d'extinction/d'absorption molaire est inférieur à $10 \text{ litres} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre à l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (1) (5). Voir également l'annexe 1.

Les résultats de l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU récemment évalué (6) (7) (8) (9) ont été comparés aux effets de phototoxicité aiguë in vivo chez les animaux et chez les humains, et l'essai s'est révélé fiable pour la prévision de ces effets. L'essai n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocarcinogénicité, et il ne permet pas non plus d'évaluer le pouvoir phototoxique. Par ailleurs, cet essai n'est pas conçu pour prendre en compte les mécanismes indirects de la phototoxicité, les effets des métabolites de la substance d'essai, ou les effets des mélanges.

Alors que l'utilisation de systèmes d'activation métabolique est nécessaire en règle générale pour tous les tests in vitro de prédiction du potentiel génotoxique ou cancérogène, dans le cas de la phototoxicologie, on ne dispose jusqu'à présent que de rares exemples de produits chimiques qui nécessitent une transformation métabolique pour agir comme une phototoxine in vivo ou in vitro. Par conséquent, il ne paraît pas utile ni scientifiquement fondé de réaliser le présent essai en présence d'un système d'activation métabolique.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Irradiance: intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m^2 ou en mW/cm^2 .

Dose de lumière: quantité (= intensité \times temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= $W \times s$) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou J/cm^2 .

Bandes de longueurs d'ondes de la lumière UV: les désignations recommandées par la CIE (Commission internationale de l'éclairage) sont: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) et UVC (100-280 nm). D'autres désignations sont également utilisées; la limite entre UVB et UVA est souvent placée à 320 nm, et les UVA peuvent être subdivisés en UV-A1 et UV-A2 avec une limite à environ 340 nm.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, absorption du colorant vital rouge neutre dans les lysosomes cellulaires), qui, en fonction de l'effet mesuré et du type de test utilisé, correspond au nombre total et/ou à la vitalité des cellules.

Viabilité cellulaire relative: viabilité cellulaire exprimée par rapport aux témoins négatifs (solvant) qui ont été prélevés tout ou long de la procédure (soit +Irr soit -Irr), mais non traités par un produit chimique.

PIF (Photo Irritation Factor — Facteur de photo-irritation): facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (CE_{50}) de la substance chimique d'essai, obtenues en absence (-Irr) ou en présence (+Irr) d'une irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

CE_{50} : concentration de la substance chimique d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 50 pour cent.

MPE (Mean Photo Effect — Photo-effet moyen): mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé de deux courbes concentration-effet obtenues avec (+Irr) ou sans (-Irr) irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

Phototoxicité: réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit chimique.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'une substance chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique de lumière solaire simulée. Dans cet essai, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red — NR] 24 heures après traitement par le produit chimique mis à l'essai et irradiation (10). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale sensible entraîne une fragilité lysosomale et d'autres modifications qui deviennent graduellement irréversibles. Ces modifications induites par l'action de xénobiotiques entraînent une diminution de la fixation du rouge neutre, sur la base de laquelle on peut distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes ou abîmées.

▼B

Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 heures jusqu'à formation de monocouches. Pour chaque substance chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 heure avec 8 concentrations distinctes de la substance chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à la dose d'irradiation non cytotoxique la plus élevée, tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité. Dans les deux plaques, le milieu de traitement est ensuite remplacé par un milieu de culture et, après une nouvelle période d'incubation de 24 heures, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake — NRU). La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins de solvant non traités, est calculée pour chaque concentration d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence et en absence d'irradiation sont comparées, généralement au niveau CE₅₀, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 pour cent par rapport aux témoins non traités.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1 **Préparations**

1.4.1.1 *Cellules*

Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris, Balb/c 3T3, clone 31, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginie, Etats-Unis), ou de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, Royaume-Uni) a été utilisée dans l'étude de validation et il est donc recommandé que les cellules proviennent d'un dépositaire de cellules bien qualifié. D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi donner de bons résultats avec le même protocole d'essai si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules. Il convient toutefois d'en démontrer l'équivalence.

Les cellules doivent être régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si aucun n'est trouvé (11).

Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UV des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle qualité décrite dans la présente méthode. Dans la mesure où la sensibilité aux UVA des cellules peut augmenter avec le nombre de passages, il convient d'utiliser des cellules Balb/c 3T3 ayant subi le moins de passages possibles, de préférence moins de 100 (voir point 1.4.2.2 et annexe 2).

1.4.1.2 *Milieus et conditions de culture*

Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés doivent être utilisés pour le passage systématique des cellules et pendant la procédure d'essai. Par exemple, pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enrichi avec 10 pour cent de sérum de veau nouveau-né, de glutamine (4mM), de pénicilline (100 UI) et de streptomycine (100 µg/ml), et incubé à 37 °C en atmosphère humidifiée, avec une teneur en CO₂ de 5 à 7,5 pour cent selon le tampon (voir point 1.4.1.4, second paragraphe). Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales historiques des cellules ou de la lignée cellulaire utilisées.

1.4.1.3 *Préparation des cultures*

Des cellules provenant de cultures mères congelées sont mises en culture à une densité appropriée dans le milieu de culture, et sont repiquées au moins une fois avant d'être utilisées pour le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU.

▼B

Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture estensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 heures après la mise en culture des cellules. Pour les cellules Balb/c 3T3 cultivées sur des plaques à 96 puits, la densité cellulaire recommandée est de 1×10^4 cellules par puits.

Pour chaque substance chimique testée, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées parallèlement pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+ Irr) et l'autre maintenue à l'obscurité (- Irr).

1.4.1.4 *Préparation de la substance d'essai*

Les substances chimiques de l'essai doivent être fraîchement préparées, juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'elles sont conservables. Il est recommandé de procéder à la manipulation des substances chimiques et au traitement initial des cellules dans des conditions d'éclairage permettant d'éviter la photoactivation ou la dégradation de la substance d'essai avant irradiation.

Les substances chimiques de l'essai doivent être dissoutes dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution — EBSS) ou d'autres solutions tamponnées physiologiquement équilibrées, exemptes de constituants protéiques qui absorbent la lumière (par exemple, indicateurs pH colorés et vitamines), afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation. Sachant que, pendant l'irradiation, les cellules sont maintenues pendant 50 minutes environ en dehors de l'incubateur CO₂, des précautions doivent être prises pour éviter l'alcalinisation. Avec des solutions faiblement tamponnées, telles que l'EBSS, il convient alors d'incuber les cellules à 7,5 pour cent de CO₂. Si les cellules sont incubées à 5 pour cent de CO₂ seulement, un tampon plus fort doit être utilisé.

Les substances chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissoutes dans des solvants appropriés. Si un solvant est utilisé, il doit être présent à un volume constant dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs (solvant) et dans toutes les concentrations de la substance chimique d'essai, et être en outre non cytotoxique à la concentration utilisée. Les concentrations de la substance chimique doivent être sélectionnées de façon à éviter les précipités ou les solutions troubles.

Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avant utilisation, notamment les risques de réaction avec la substance chimique d'essai, l'atténuation de l'effet phototoxique, les propriétés de fixation des radicaux, et/ou la stabilité du produit chimique dans le solvant.

Si nécessaire, on peut recourir à un mélangeur Vortex et/ou à la sonication et/ou à un chauffage à des températures appropriées pour faciliter la solubilisation, à moins qu'une telle manipulation n'affecte la stabilité de la substance chimique.

▼B1.4.1.5 *Conditions d'irradiation*1.4.1.5.1 *Source de lumière*

Le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés est le facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et de la lumière visible sont généralement associés à des réactions phototoxiques *in vivo* (3) (12), tandis que les UVB sont moins pertinents, mais très cytotoxiques, avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1 000 entre 313 et 280 nm (13). Parmi les critères présidant au choix de la source de lumière appropriée, il est essentiel que la source de lumière émette des longueurs d'onde absorbées par la substance chimique d'essai et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai d'exposition raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photocytotoxiques connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas trop endommager le système d'essai, par exemple par l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

La lumière solaire simulée par des simulateurs solaires est considérée comme la source optimale de lumière artificielle. La distribution du pouvoir d'irradiation du simulateur solaire filtré doit être proche de celle de la lumière du jour extérieure donnée dans le document (14). Des arcs au xénon ou des arcs aux halogénures de métal-mercure (dopé) peuvent être utilisés comme simulateurs solaires (15). Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils reproduisent moins bien la lumière solaire que les simulateurs utilisant des arcs au xénon. Dans la mesure où tous les simulateurs solaires émettent d'importantes quantités d'UVB, ils doivent être équipés de filtres adéquats pour atténuer les longueurs d'onde UVB hautement cytotoxiques. Dans la mesure où les matériaux plastiques utilisés pour les cultures cellulaires contiennent des stabilisateurs UV, le spectre doit être mesuré à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Abstraction faite des mesures prises pour atténuer une part du spectre par filtration, ou des effets de filtre inévitables liés aux appareils, le spectre enregistré sous ces filtres ne doit pas dévier de la norme de lumière du jour extérieure (14). Les documents (8) (16) donnent un exemple de distribution de l'irradiance spectrale du simulateur solaire équipé de filtres qui a été utilisé dans l'étude de validation du test *in vitro* 3T3 NRU. Voir également la Figure 1 de l'annexe 2.

1.4.1.5.2 *Dosimétrie*

L'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque essai de phototoxicité, à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié. L'intensité doit être mesurée à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Le radiomètre UV doit avoir été étalonné par rapport à la source. Les performances du radiomètre UV doivent être contrôlées. À cet effet, on recommande l'utilisation d'un second radiomètre UV de référence, du même type et étalonné de la même façon. Dans l'idéal, à intervalles plus grands, il conviendrait d'utiliser un spectroradiomètre pour mesurer l'irradiance spectrale de la source de lumière filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande.

Une dose de 5 J/cm² (dans la plage des UVA) est non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter les substances chimiques et déclencher des réactions phototoxiques (6) (17). Par exemple, pour obtenir 5 J/cm² dans un délai de 50 minutes, l'irradiance a été réglée à 1,7 mW/cm². Voir la Figure 2 de l'annexe 2. En cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la dose d'irradiation en choisissant une dose qui ne soit pas nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour exciter les phototoxines standard. La durée de l'exposition à la lumière se calcule de la façon suivante:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{irradiation dose } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiance } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2 **Conditions d'essai**1.4.2.1 *Concentrations de la substance d'essai*

Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+Irr) et en absence (-Irr) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début puis après un délai de 60 minutes (ou à la durée employée dans l'essai), dans la mesure où celle-ci peut varier avec le temps ou au cours de l'exposition. Pour éviter toute toxicité induite par des conditions de culture inappropriées ou des substances chimiques hautement acides ou alcalines, il faut que le pH des cultures cellulaires, auxquelles la substance d'essai a été ajoutée, soit dans une plage comprise entre 6,5 et 7,8.

La concentration la plus élevée de la substance d'essai doit être dans les conditions d'essai physiologiques, par exemple le stress pH ou osmotique doit être évité. Selon la substance d'essai, il peut s'avérer nécessaire d'envisager d'autres propriétés physico-chimiques comme facteurs limitant la concentration d'essai la plus élevée. Pour les substances relativement insolubles, mais non toxiques à des concentrations allant jusqu'au point de saturation, il y a lieu de procéder à des essais pour déterminer la concentration la plus élevée qui puisse être atteinte. De manière générale, il y a lieu d'éviter les effets de précipités de la substance chimique à toutes les concentrations d'essai. La concentration maximale d'une substance d'essai ne doit pas dépasser 1 000 µg/ml, et l'osmolarité ne doit pas dépasser 10 milliosmoles. Il convient d'utiliser une série de dilutions en progression géométrique comprenant 8 concentrations de la substance d'essai avec un facteur de dilution constant (voir point 2.1, second paragraphe).

Si les informations provenant d'expériences préalables établissent qu'une substance chimique n'est pas cytotoxique jusqu'à la concentration limite dans l'obscurité (-Irr), mais se révèle hautement cytotoxique exposée à la lumière (+Irr), les plages de concentrations à choisir pour l'expérience (+Irr) peuvent être différentes de celles utilisées pour l'expérience (-Irr), de façon à garantir une qualité adéquate des résultats.

1.4.2.2 *Contrôles/Témoins*1.4.2.2.1 *Sensibilité des cellules aux radiations, données historiques :*

la sensibilité des cellules à la source lumineuse doit être régulièrement contrôlée (tous les cinq passages environ), par évaluation de leur viabilité après une exposition à des doses croissantes d'irradiation. Pour cette évaluation, plusieurs doses d'irradiation doivent être utilisées, y compris des niveaux significativement supérieurs à ceux de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU. La méthode la plus simple pour quantifier ces doses consiste à mesurer les UV à la source. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU. Elles sont irradiées le jour suivant, et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Il faut alors que la dose non cytotoxique la plus élevée (par exemple, 5 J/cm² [UVA] dans l'étude de validation) soit suffisante pour classer correctement les substances de référence (Tableau 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilité aux radiations, contrôle de l'essai en cours :

l'essai répond aux critères de qualité si les témoins de contrôle négatifs (solvant) irradiés ont une viabilité supérieure ou égale à 80 pour cent de celle des témoins de contrôle négatifs non irradiés.

1.4.2.2.3. Viabilité des témoins de solvant

la densité optique absolue (OD₅₄₀ NRU), mesurée dans l'extrait NR des témoins de solvant indique si les 1×10^4 cellules mises en culture par puits se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours de l'essai. Un essai répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne OD₅₄₀ NRU des témoins non traités est $> 0,4$ (c'est-à-dire approximativement vingt fois l'absorbance de fond du solvant).

1.4.2.2.4. Témoin positif :

Pour chaque essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurremment. La chlorpromazine (CPZ) est recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis: CPZ irradiée (+Irr): CE₅₀ = 0,1 à 2,0 µg/ml; CPZ non irradiée (-Irr): CE₅₀ = 7,0 à 90,0 µg/ml. Le facteur de photo-irritation (PIF) doit être > 6 . Les données historiques du témoin positif doivent être suivies.

À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité de la substance chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles.

1.4.3. **Mode opératoire (6) (7) (8) (16) (17):**1.4.3.1. *Premier jour:*

Verser 100 µl de milieu de culture dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage de culture tissulaire à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 µl d'une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml en milieu de culture, (= 1×10^4 cellules/puits). Préparer deux plaques pour chaque série des concentrations de la substance à tester, ainsi que pour les témoins négatifs (de solvant) et positifs.

Incuber les cellules pendant 24 heures (voir point 1.4.1.2) jusqu'à formation d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

1.4.3.2. *Deuxième jour:*

Après incubation, décanter le milieu de culture pour le séparer des cellules et laver délicatement avec 150µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation. Ajouter 100 µl de la solution tamponnée contenant la concentration appropriée de la substance chimique à tester, ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes de la substance chimique à tester. Incuber les cellules avec la substance chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (voir points 1.4.1.2 et 1.4.1.4, second paragraphe).

Sur les deux plaques préparées pour chaque série de concentrations, ainsi que pour les témoins, une plaque est sélectionnée, généralement au hasard, pour la détermination de la cytotoxicité (-Irr) (par exemple, la plaque témoin), et l'autre (la plaque de traitement) pour la détermination de la photocytotoxicité (+Irr).

▼B

Pour réaliser la partie (+Irr) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes environ à travers le couvercle de la plaque à 96 puits, à la dose maximale de radiations non cytotoxique (voir également annexe 2). Conserver les plaques identiques non irradiées (-Irr) à température ambiante dans une boîte obscure pendant 50 minutes (= durée de l'exposition à la lumière).

Décarter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation, mais ne contenant pas la substance d'essai. Remplacer le tampon par le milieu de culture et incuber (voir le point 1.4.1.2) jusqu'au lendemain (18-22 heures).

1.4.3.3 *Troisième jour:*1.4.3.3.1 **Évaluation microscopique**

Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter la croissance, la morphologie et l'intégrité de la monocouche. Les changements morphologiques et les effets sur la croissance cellulaire doivent être enregistrés.

1.4.3.3.2 **Test de fixation du rouge neutre**

Laver les cellules avec 150 µl de la solution tamponnée préchauffée. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 µl d'un rouge neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine chlorhydrate, numéro EINECS 209-035-8; numéro CAS 553-24-2; CI. 50040) à 50 µg/ml dans un milieu sans sérum (16) et incuber comme décrit au point 1.4.1.2., pendant 3 heures. Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 µl du tampon. Décarter et évacuer complètement le tampon en excès par absorption ou centrifugation.

Ajouter exactement 150 µl de solution de désorption NR (solution fraîchement préparée de 49 parts d'eau + 50 parts d'éthanol + 1 part d'acide acétique).

Passer rapidement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes, jusqu'à ce que le NR soit extrait des cellules et forme une solution homogène.

Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540 nm dans un spectrophotomètre en utilisant les essais à blanc comme référence. Sauvegarder les données dans un format de fichier électronique approprié en vue d'une analyse ultérieure.

2. RÉSULTATS2.1. **QUALITÉ ET QUANTITÉ DES DONNÉES**

Les données d'essai doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-effet obtenues avec et sans irradiation, et si possible de la concentration de la substance d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de moitié (CE₅₀). Si on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster à la fois la gamme des concentrations et l'intervalle entre chaque concentration, afin qu'il y ait concordance entre la courbe et les données expérimentales.

Pour les résultats clairement positifs ou clairement négatifs (voir point 2.3), l'expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des gammes de concentrations, est généralement suffisante.

▼B

Les tests qui donnent des résultats équivoques, limites ou incertains doivent être vérifiés par un essai supplémentaire (voir également point 2.4, second paragraphe). Si cet essai s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales, et notamment la plage ou l'espacement des concentrations, le temps de préincubation, et le temps d'exposition à l'irradiation. Une réduction de cette durée d'exposition peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Pour procéder à l'évaluation des données, il peut être nécessaire de calculer un facteur de photo-irritation (PIF) ou un photo-effet moyen (MPE).

Pour le calcul des mesures de photocytotoxicité (voir ci-après), l'ensemble des valeurs discrètes de concentration-effet doit être déterminé par une courbe concentration-effet continue appropriée (modèle). On fait généralement concorder la courbe aux données en appliquant une méthode de régression non linéaire (18). Pour évaluer l'influence de la variabilité des données sur la courbe ajustée, il est recommandé d'employer une procédure de type «bootstrap».

On calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

S'il n'est pas possible de calculer une CE_{50} en présence ou en l'absence de lumière, il ne sera pas possible de déterminer un PIF pour la substance d'essai. Le photo-effet moyen (MPE) est une mesure basée sur une comparaison des courbes concentration-effet complètes (19). Il correspond à la moyenne pondérée d'un ensemble représentatif de valeurs du photo-effet:

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Le photo-effet PE_C à une concentration C est défini comme le produit de la réponse-effet RE_C et de la dose-effet DE_C , soit $\text{PE}_C = \text{RE}_C \times \text{DE}_C$. La réponse-effet RE_C correspond à la différence entre les réponses observées en absence et en présence de lumière, soit $\text{RE}_C = R_C(-\text{Irr}) - R_C(+\text{Irr})$. La dose-effet est donnée par la formule suivante

$$\text{DE}_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

où C^* représente la concentration équivalence, c'est-à-dire la concentration à laquelle la réponse $+\text{Irr}$ est équivalente à la réponse $-\text{Irr}$ à la concentration C . S'il n'est pas possible de déterminer C^* parce que les valeurs de la courbe $+\text{Irr}$ sont systématiquement supérieures ou inférieures à $R_C(-\text{Irr})$, la dose-effet est fixée à 1. Les facteurs de pondération w_i sont donnés par la valeur la plus élevée, soit $w_i = \text{MAX} \{R_i(+\text{Irr}), R_i(-\text{Irr})\}$. La grille de concentration C_i est choisie de façon à ce que le même nombre de points figure dans chaque intervalle de concentration défini par les valeurs de concentration utilisées dans l'expérience. Le calcul du MPE est limité par la valeur de concentration maximale à laquelle au moins une des deux courbes montre une valeur de réponse d'au moins 10 pour cent. Si cette concentration maximale est supérieure à la concentration la plus élevée utilisée dans l'expérience $+\text{Irr}$, la partie résiduelle de la courbe $+\text{Irr}$ est ajustée à la valeur de réponse «0». La substance chimique est ensuite classée ou non comme étant photo-toxique, selon que la valeur MPE est supérieure ou non à une valeur de seuil correctement choisie ($\text{MPE}_C = 0,15$).

▼B

Un logiciel de calcul du PIF et du MPE est disponible (20).

2.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Sur la base de l'étude de validation (8), une substance d'essai dont le PIF est < 2 ou le MPE < 0,1 ne présente «aucune phototoxicité». Un PIF > 2 et < 5 ou un MPE > 0,1 et < 0,15 indique une «phototoxicité probable» et un PIF > 5 ou un MPE > 0,15 indique une «phototoxicité».

Pour les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois, il est préconisé de procéder à un essai sur les substances de référence données dans le Tableau 1, avant d'entreprendre l'évaluation phototoxique de substances d'essai. Les valeurs PIF ou MPE doivent être proches des valeurs données dans le tableau 1.

Tableau 1

Nom de la substance chimique	N° EINECS	N° CAS	PIF	MPE	Pic d'absorption	Solvant ⁽¹⁾
Amiodarone chlorhydrate	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27 - 0,54	242 nm 300 nm (épaulement)	éthanol
Chlorpromazine chlorhydrate	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33 - 0,63	309 nm	éthanol
Norfloxacine	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34 - 0,90	316 nm	acétonitrile
Anthracène	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19 - 0,81	356 nm	acétonitrile
Protoporphyrine IX, disodium	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54 - 0,74	402 nm	éthanol
L — Histidine		[7006-35-1]	pas de PIF	0,05 - 0,10	211 nm	eau
Hexachlorophène	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00 - 0,05	299 nm 317nm (épaulement)	éthanol
Sulfate de sodium et de dodécyle	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00 - 0,05	pas d'absorption	eau

⁽¹⁾ Solvant utilisé pour mesurer l'absorption.

2.4. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Si des effets phototoxiques ne sont observés qu'à la concentration d'essai maximale (en particulier pour les substances d'essai solubles dans l'eau), d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques. Il peut s'agir notamment d'étudier l'absorption cutanées et l'accumulation du produit chimique dans la peau, et/ou de soumettre le produit à un autre type d'essai, en recourant par exemple à des essais in vitro sur peau humaine ou animale, ou sur modèle de peau.

▼B

En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+Irr et -Irr) et si la solubilité faible du produit dans l'eau a limité les concentrations d'essai, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un essai de confirmation avec un autre modèle.

3. RAPPORT**RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir au minimum les informations suivantes:

Substance d'essai:

- données d'identification, nom générique commun et numéros IUPAC et CAS si connus
- nature physique et pureté
- propriétés physico-chimiques importantes pour la réalisation de l'étude
- spectre d'absorption UV/lumière visible
- stabilité et photostabilité si connues

Solvant:

- justification du choix du solvant
- solubilité de la substance d'essai dans le solvant
- pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement

Cellules:

- type et provenance des cellules
- absence de mycoplasmes
- nombre de passages cellulaires, si connu
- sensibilité des cellules aux radiations, déterminée avec l'appareil d'irradiation utilisé dans l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU.

Conditions expérimentales (1) *incubation avant et après traitement*:

- type et composition du milieu de culture
- conditions d'incubation (concentration de CO₂, température, humidité)
- durée de l'incubation (avant traitement et après traitement)

Conditions expérimentales (2) *traitement par la substance chimique*:

- justification du choix des concentrations de substance d'essai utilisées, en présence et en absence de rayonnement
- en cas de solubilité limitée du produit chimique et d'absence de cytotoxicité, justification de la concentration maximale utilisée
- type et composition du milieu de traitement (solution saline tamponnée)
- durée du traitement chimique.

Conditions expérimentales (3) *Irradiation*:

- justification de la source de lumière utilisée

▼B

- fabricant et type de source de lumière et de radiomètre
- caractéristiques d'irradiance spectrale de la source de lumière
- caractéristiques de transmission/absorption du (des) filtre(s) utilisé(s)
- caractéristiques du radiomètre et modalités d'étalonnage
- distance entre la source de lumière et le système d'essai
- irradiance UVA à cette distance, exprimée en mW/cm^2
- durée de l'exposition UV/lumière visible
- dose d'UVA (irradiance \times temps), exprimée en J/cm^2
- température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité.

Conditions expérimentales (4) *test NRU*:

- composition du milieu de traitement NR
- durée de l'incubation dans NR
- conditions d'incubation (concentration de CO_2 , température, humidité)
 - d'extraction du NR (agent d'extraction, durée)
 - longueur d'ondes utilisée pour la lecture spectrophotométrique de la densité optique du NR
 - seconde longueur d'ondes (référence), le cas échéant
 - contenu de l'échantillon destiné à l'essai à blanc du spectrophotomètre, le cas échéant.

Résultats:

- viabilité cellulaire obtenue pour chaque concentration de la substance d'essai, exprimée en pour cent de la viabilité moyenne des témoins de solvant
- courbes de concentration-effet (concentration de la substance chimique — viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +Irr et -Irr parallèles
- analyse des courbes concentration-effet: si possible, calcul/détermination des CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr)
- comparaison des deux courbes concentration-effet obtenues en présence et en l'absence de rayonnement, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE)
- critères d'acceptation de l'essai, témoin négatif (solvant) simultané:
- viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées
- données historiques sur les témoins négatif et de solvant, moyennes et écarts types
- critères d'acceptation de l'essai, témoin positif simultané:

▼B

— CE₅₀ (+Irr) et CE₅₀ (-Irr) et PIF/MPE du produit chimique témoin positif

— données historiques sur le produit chimique témoin positif: CE₅₀ (+Irr) et CE₅₀ (-Irr) et PIF/MPE moyennes et écarts types.

Discussion des résultats

Conclusions

4. BIBLIOGRAPHIE

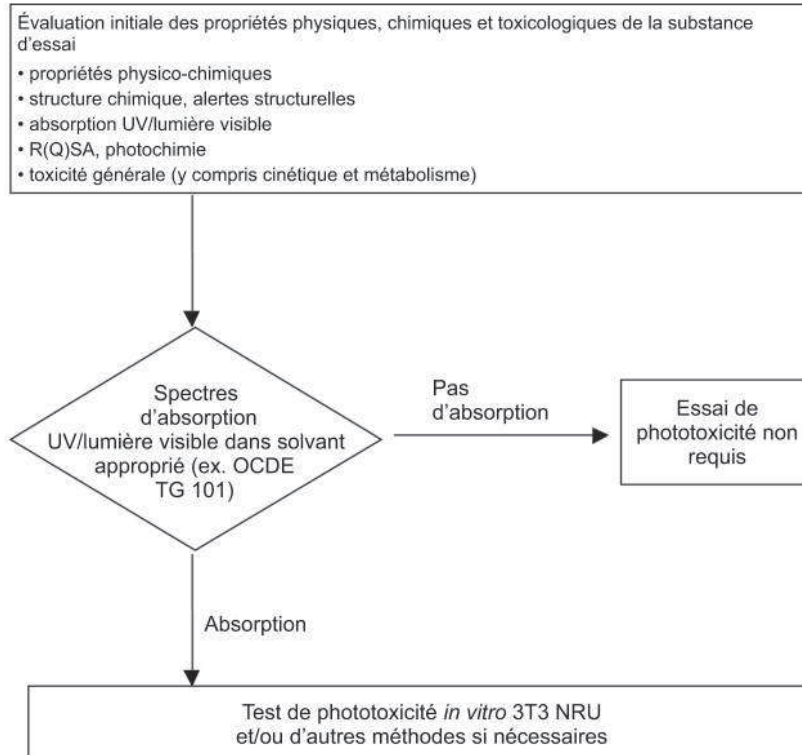
- (1) Lovell W.W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7, p. 95-102.
- (2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam, p. XI-XXXV.
- (3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA*, 22, p. 314-348.
- (4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.
- (5) OECD (1997). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.
- (6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro* 8, p. 793-796.
- (7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA*, 26, p. 7-8.
- (8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, p. 305-327.
- (9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
- (10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24 p. 119-124.
- (11) Hay, R.J. (1988). The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, p. 225-237.

▼B

- (12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.
- (13) Tyrrell, R.M., Pidoux, M. (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, p. 1825-1829.
- (14) ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.
- (15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275
- (16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998, p. 18.
- (17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, p. 679-708.
- (18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, p. 127-138.
- (19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, p. 445-462.
- (20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

ANNEXE I

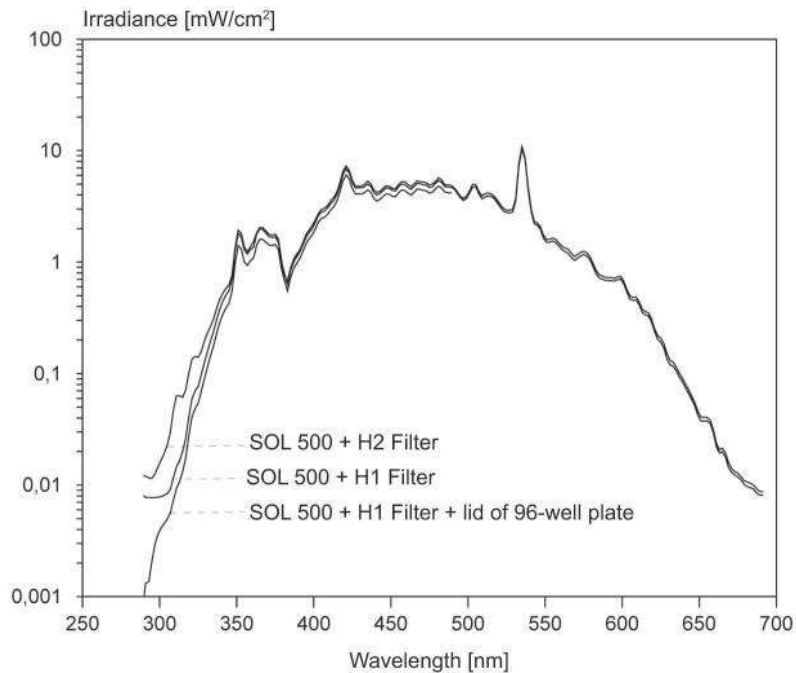
Rôle de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU dans une approche séquentielle des essais de phototoxicité des substances chimiques

▼B

ANNEXE 2

Figure 1

Distribution spectrale énergétique d'un simulateur solaire équipé de filtres



(voir point 1.4.1.5, second paragraphe)

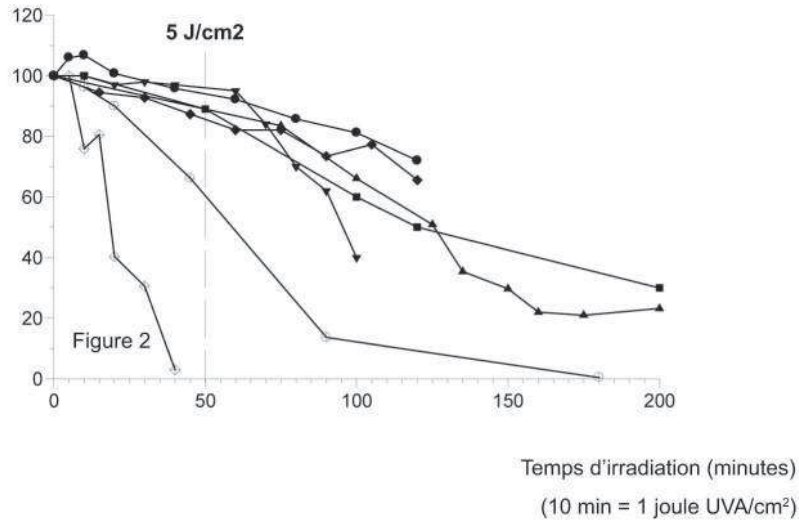
La figure 1 donne un exemple de distribution acceptable de l'énergie spectrale d'un simulateur solaire équipé de filtres. Elle correspond à la source aux halogénures de métaux dopés utilisée dans l'essai de validation du test 3T3 NRU (6) (8) (17). Cette figure fait apparaître l'effet des deux filtres distincts, ainsi que l'effet de filtration de la plaque à 96 puits. Le filtre H2 est utilisé uniquement avec les systèmes d'essai qui peuvent supporter une quantité plus importante d'UVB (essai sur modèle de peau et essai de photo-hémolyse des globules rouges). Dans l'essai 3T3 NRU, le filtre H1 a été utilisé. La figure montre que l'effet de filtration supplémentaire de la plaque est principalement observé dans la plage des UVB, laissant néanmoins suffisamment d'UVB dans le spectre d'irradiation pour exciter les substances chimiques qui absorbent généralement la lumière dans la plage des UVB, telles que l'amiodarone (voir le tableau 1).

▼B

Figure 2

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation (mesurée dans la plage des UVA)

Viabilité cellulaire (% de fixation du rouge neutre des témoins dans l'obscurité)

Temps d'irradiation (minutes) (10 min = 1 joule UVA/cm²)

(voir point 1.4.1.5.2, second paragraphe, et points 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation avec le simulateur solaire utilisé dans l'essai de validation du test de phototoxicité 3T3 NRU, mesurée dans la plage des UVA. La figure montre les résultats obtenus dans sept laboratoires différents au cours de l'étude de prévalidation (1). Les deux courbes avec des symboles transparents ont été obtenues avec des cellules âgées (nombre de passages élevés) qu'il a fallu remplacer par de nouvelles cellules, tandis que les courbes aux symboles pleins sont associées à des cellules montrant une tolérance acceptable à l'irradiation.

C'est à partir de ces données qu'on a dérivé la dose maximale d'irradiation non cytotoxique de 5 J/cm² (ligne discontinue verticale). La ligne de pointillés horizontale montre en outre l'effet maximal d'irradiation acceptable (point 1.4.2.2).

▼ M3

B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices (LD) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne qui sont fondées sur celles-ci sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La méthode d'essai initiale visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL; LD 429 de l'OCDE, chapitre B.42 de la présente annexe), a été adoptée antérieurement (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). La révision de l'ELGL s'appuie sur l'évaluation de l'expérience acquise et des données scientifiques (12). Il s'agit de la deuxième méthode d'essai permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. L'autre méthode d'essai (LD 406 de l'OCDE, chapitre B.6 de la présente annexe) fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL présente un avantage par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de bien-être des animaux. Cette mise à jour de la méthode d'essai sur l'ELGL comprend une série de normes de performance (appendice 1) pouvant servir à évaluer l'état de validation des méthodes d'essai modifiées et/ou nouvelles, dont le fonctionnement et le mécanisme sont similaires à ceux de l'ELGL, conformément aux principes énoncés dans le document d'orientation n° 34 de l'OCDE (14).
2. L'ELGL s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et livre des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Il convient de noter que les sensibilisants légers/modérés recommandés comme témoins positifs (TP) pour les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) conviennent également à l'ELGL (6) (8) (15). La présente méthode d'essai décrit également une approche simplifiée de l'ELGL (ELGLs) optionnelle, qui pourrait nécessiter jusqu'à 40 % d'animaux en moins (16) (17) (18). Cet essai simplifié pourrait être utilisé en cas de besoin réglementaire de confirmer les prévisions négatives concernant le pouvoir de sensibilisation cutanée, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente méthode d'essai. La prédiction d'un résultat négatif s'appuie sur toutes les informations disponibles, comme cela est décrit au paragraphe 4. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée est préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si, en dépit des prévisions, l'ELGL simplifié donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat. L'ELGLs ne convient pas pour identifier les substances d'essai sensibilisantes pour la peau lorsque des données sur la relation dose-effet sont nécessaires, comme pour la sous-catégorisation conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, et à la classification du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques de l'Organisation des Nations-Unies.

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. L'ELGL constitue une méthode de remplacement pour identifier les substances et mélanges chimiques susceptibles d'exercer une action sensibilisante sur la peau. Cela n'implique pas que l'ELGL doive systématiquement remplacer les essais sur cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (14) mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces essais, et dont les résultats positifs ou négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire. Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in

▼ M3

vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL avec la substance considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL (voir paragraphe 5), et aident à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Elle est néanmoins susceptible de réduire le nombre d'animaux requis à ces fins. En outre, l'ELGL propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. L'ELGL se fonde sur les réactions immunologiques induites par les produits chimiques pendant la phase d'induction de la sensibilisation. Contrairement aux essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), l'ELGL ne s'appuie pas sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (13). C'est pourquoi l'ELGL réduit la souffrance et le stress chez les animaux. Malgré les avantages de l'ELGL par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE, certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B.6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, résultats faussement négatifs avec certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (19) (20), ou solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (21) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Par ailleurs, en examinant la base de données de validation, limitée et essentiellement constituée de formulations de pesticides, on observe que l'ELGL donne plus de résultats positifs que l'essai sur cobayes pour ces types de substances (22). Concernant les formulations, il est cependant envisageable de tester des substances similaires aux effets connus en tant que substances étalons, afin de prouver que l'ELGL est efficace (voir paragraphe 16). Dans ces limites, l'ELGL est applicable à toute substance qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. L'ELGL repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène, et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 3, il est justifié de classer la substance d'essai comme substance ayant un pouvoir de sensibilisation cutanée. Les procédures décrites ici mesurent la prolifération cellulaire dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage à l'aide d'un marqueur radioactif in vivo. Il est toutefois possible de faire appel à d'autres paramètres pour évaluer le nombre de cellules en prolifération, à condition de respecter strictement les normes de performance (appendice 1).

▼ M3**DESCRIPTION DE L'ESSAI****Choix des espèces animales**

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides, de souche CBA/Ca ou CBA/J. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minimale entre eux n'excédant pas 20 % du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (23), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie est maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances et mélanges chimiques solides sont dissouts ou dispersés dans des solvants/véhicules puis dilués, s'il y a lieu, avant d'être appliqués sur l'oreille des souris. Les substances et mélanges chimiques liquides peuvent être appliqués purs ou préalablement dilués. Les substances et mélanges chimiques insolubles, comme ceux que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumis à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour laquelle l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation de plus. Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de

▼ M3

stimulation de plus de 3 points par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP est choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 20 est considéré comme excessif, par exemple). Les substances utilisées en priorité comme TP sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), ainsi que le mercaptobenzothiazole (N° CAS 149-30-4) à 5 % dans le N,N-diméthylformamide (voir appendice 1, tableau 1). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, dans certaines circonstances des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent convenir pour des laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).
13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.
14. Les investigateurs gardent à l'esprit que faire une étude de TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus avec la substance d'essai depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent est réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (12).
15. Quoique le témoin positif doive être testé dans un véhicule déclenchant un effet constant (par exemple acétone/huile d'olive (4:1, v/v)], certaines situations réglementaires nécessitent aussi l'essai d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (24). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un essai témoin indépendant pour le véhicule du TP.
16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substances. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:
 - similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances d'essai à tester,
 - caractéristiques physiques et chimiques connues,
 - données connues provenant de l'ELGL,
 - données connues provenant d'autres modèles animaux et/ou de l'être humain.

▼ M3**MODE OPÉRATOIRE****Nombre d'animaux et doses**

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe témoin négatif concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un témoin positif (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-14). On peut envisager de tester différentes doses du témoin positif, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (3) et (5). Des doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée fait l'objet d'une justification scientifique. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou des analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (3) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Le véhicule ne doit pas perturber ou introduire un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (19) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclameront un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veillera tout particulièrement à ce que les substances d'essai hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 35). En outre, il est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP en se fondant sur des données individuelles (12). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. D'autres autorités sont toutefois susceptibles d'accepter des données par groupe d'animaux, auquel cas le choix d'un relevé des résultats par animal ou par groupe est laissé à la discrétion des expérimentateurs.

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

▼ M3

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, le sixième jour, cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations cutanées locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaissement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'ELGL principal est la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaissement de l'oreille de 25 % (26) (27), toute augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins permet aussi d'identifier les produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) (36) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilette modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur ou un stress légers et passagers; baisse du poids corporel $> 5\%$ entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés (37).

▼ **M3****Programme expérimental de l'étude principale**

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

- *Premier jour*: Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µl d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille.
- *Deuxième et troisième jours*: Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.
- *Quatrième et cinquième jours*: Aucun traitement.
- *Sixième jour*: Noter le poids de chaque animal. Injecter 250 µl d'une solution tampon phosphate stérile [phosphate-buffered saline] (PBS) contenant 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) de (³H)-méthylthymidine dans la veine caudale de toutes les souris traitées et témoins. Il est également possible d'injecter 250 µL de PBS stérile contenant 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) de ¹²⁵I-iododésoxyuridine et de la fluorodésoxyuridine à 10^{-5} M dans la veine caudale de toutes les souris. Euthanasier les animaux cinq heures (5 h) plus tard. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris, puis placer ceux d'un même individu dans une solution de PBS (approche par animal), ou placer tous les ganglions lymphatiques d'un même groupe de traitement dans la même solution PBS (approche par groupe). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (12). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour l'approche par animal comme pour l'approche par groupe, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire. Les CGL sont lavées deux fois avec un excès de PBS et l'ADN précipite par l'action d'acide trichloracétique à 5 % à 4 °C pendant 18 heures (3). Les granules sont soit remis en suspension dans 1 mL d'acide trichloracétique et transférés dans des flacons à scintillation contenant 10 mL de scintillateur liquide pour le comptage des ³H, soit transférés directement dans des tubes de comptage gamma pour le comptage de ¹²⁵I.

Détermination de la prolifération cellulaire (radioactivité incorporée)

27. L'incorporation de la ³H-méthylthymidine se mesure par comptage à β-scintillation en désintégrations par minute (DPM). L'incorporation de ¹²⁵I-iododésoxyuridine, mesurée par comptage de ¹²⁵I, s'exprime également en DPM. En fonction de l'approche adoptée, l'incorporation s'exprimera en DPM/souris (approche par animal) ou en DPM/groupe de traitement (approche par groupe).

ELGL simplifié (ELGLs)

28. Si la réglementation demande de confirmer les prévisions négatives quant au pouvoir de sensibilisation cutanée, il est possible de mettre en œuvre l'ELGLs (16) (17) (18), qui requiert moins d'animaux, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente méthode d'essai. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée doit être préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si l'ELGLs donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat.

▼ **M3**

29. La seule différence entre les méthodes ELGL et ELGLs est la réduction du nombre de groupes de dose; c'est pourquoi l'ELGLs ne livre pas d'informations sur la relation dose-effet. Par voie de conséquence, l'ELGLs ne saurait être appliqué lorsque des données sont nécessaires en la matière. Tout comme pour la méthode ELGL utilisant plusieurs doses, la concentration maximale de substance d'essai choisie pour l'ELGLs correspond à la concentration maximale n'induisant pas de toxicité systémique manifeste et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris (voir paragraphe 18).

OBSERVATIONS**Observations cliniques**

30. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examinera attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (37).

Poids corporels

31. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

32. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS). Pour l'approche par animal, cet IS s'obtient en divisant la moyenne des DPM/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des DPM/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule. L'indice de stimulation moyen pour les témoins traités avec le véhicule est alors égal à 1. Pour l'approche par groupe, l'IS s'obtient en divisant l'incorporation du produit radiomarqué dans chaque groupe de traitement par l'incorporation observée dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule: on obtient alors un IS moyen.
33. Un résultat est considéré comme positif lorsque l'indice de stimulation est supérieur ou égal à 3. Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite est jugé positif (4) (5) (6).
34. Pour clarifier les résultats, diverses propriétés de la substance d'essai sont prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (7).
35. Le relevé des données radioactives pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'importance d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple comparaison par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de Williams pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, le chercheur doit être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoiqu'il en soit, l'investigateur peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

▼ **M3****RÉSULTATS ET RAPPORT****Résultats**

36. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau. Avec l'approche par animal, indiquer les DPM relevées pour chaque individu, la moyenne des DPM/souris du groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent. Avec l'approche par groupe, indiquer la moyenne et la médiane des DPM ainsi que la moyenne des IS de chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

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

Substance d'essai et substances témoins:

- données d'identification (par exemple numéro CAS et numéros CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),
- s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

- données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'essai:

- source des souris CBA,
- état microbiologique des animaux, s'il est connu,
- nombre et âge des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

- détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,
- justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),
- concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,
- détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture, et provenance de l'eau),
- détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,
- méthodes de détermination de la toxicité,
- critères de décision concernant les études positives ou négatives,
- détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

- résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,
- résultats du laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent,

▼ **M3**

- en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

- poids corporel de chaque souris au début du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,
- moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal,
- tableau des DPM et IS pour chaque souris (approche par animal) ou moyenne et médiane des DPM et IS (approche par groupe) pour chaque groupe de traitement,
- moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des DPM/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux en cas d'approche par animal,
- indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins, en cas d'approche par groupe,
- relation dose-effet,
- analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

- bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2002), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
2. Kimber, I., et Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
3. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
4. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
5. Chamberlain, M., et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
6. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

▼ M3

8. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
9. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3): 258-273.
10. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
11. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3): 249-257.
12. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/LLNAPerfStds.pdf]
13. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
14. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Série sur les essais et évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
15. Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A., et Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
16. Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y., et Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
17. ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Avril 2007. Disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
18. ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report, The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
19. ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼ M3

20. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
21. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
22. ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report, Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
23. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7^e édition. Washington, DC: National Academies Press.
24. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
25. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice n° 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96 (S-1), 235.
27. ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
31. Hayes, B.B., et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, *Toxicol.*, 212, 60-68.
33. Vohr, H.W., and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
34. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
35. OCDE (1987), Toxicité cutanée aiguë, Ligne directrice n° 402, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]

▼ M3

36. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/Tox_workshop.htm]
37. OCDE (2000), Guidance Document on the 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. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]

▼ **M3***Appendice 1***Normes de performance pour l'évaluation des méthodes d'ELGL similaires ou modifiées proposées pour les essais de sensibilisation cutanée**

INTRODUCTION

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées ou non (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement). Conçues à partir de méthodes d'essai validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la précision et la fiabilité de méthodes analogues (aussi appelées «répliques d'essais») fondées sur des principes scientifiques similaires et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (14).
 2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire des améliorations proposées d'une méthode d'essai approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation est le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (14).
 3. La fiabilité et la précision des méthodes similaires ou modifiées proposées dans la présente méthode d'essai sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des résultats de l'ELGL. Afin d'éviter toute utilisation injustifiée d'animaux, il est fortement conseillé aux concepteurs de modèles de contacter les autorités appropriées avant d'entamer les études de validation conformément aux normes de performance et orientations fournies dans la présente méthode d'essai.
 4. Ces normes de performance, qui sont fondées sur les normes harmonisées émanant du comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12), permettent d'évaluer la validité de versions de l'ELGL similaires ou modifiées. Les normes de performance comprennent les éléments essentiels de la méthode d'essai, les produits chimiques de référence recommandés, et les minima requis en termes de précision et de fiabilité.
- 1. Éléments essentiels de la méthode d'essai**
5. Pour s'assurer qu'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée est fonctionnellement et structurellement similaire à l'ELGL et qu'elle mesure le même effet biologique, il convient d'inclure les éléments suivants dans le protocole d'essai:
 - la substance d'essai est appliquée localement sur les deux oreilles de la souris,
 - la prolifération des lymphocytes est quantifiée dans les ganglions lymphatiques qui drainent le site de l'application de la substance d'essai,
 - la prolifération des lymphocytes est mesurée pendant la phase d'induction de la sensibilisation cutanée,

▼ **M3**

- la dose maximale choisie pour la substance d'essai est la concentration maximale ne provoquant pas de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris. Pour les produits chimiques de référence positifs, la dose maximale doit être supérieure ou égale aux CE3 de l'ELGL pour les produits chimiques de référence correspondants (voir tableau 1) sans pour autant induire de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris,
- chaque étude comprend un véhicule témoin concurrent et, s'il y a lieu, un témoin positif concurrent,
- chaque groupe de dose comprend au moins quatre animaux,
- les données peuvent être collectées par animal ou par groupe d'animaux.

En cas de non-respect d'un de ces critères, les présentes normes de performance ne permettent pas de valider les méthodes similaires ou modifiées.

II. Liste minimale de produits chimiques de référence

6. On trouve dans les normes de performance harmonisées émanant du Comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12) un minimum de 18 produits chimiques de référence à utiliser, auxquelles s'ajoutent quatre autres substances de référence facultatives. Ces quatre substances donnent des faux positifs ou faux négatifs avec l'ELGL, ce qui n'arrive pas avec les essais sur l'homme ou le cobaye (chapitre B.6 ou LD 406 de l'OCDE) (13), et permet de démontrer une performance supérieure ou égale à celle de l'ELGL. Le choix de ces produits chimiques s'appuie sur les critères suivants:

- la liste de produits chimiques de référence représente, d'une part, les types de substances dont on teste généralement le pouvoir de sensibilisation cutanée et, d'autre part, l'éventail des effets détectables ou prévisibles par l'ELGL,
- ces substances présentent des structures chimiques bien définies,
- des données ELGL provenant d'essais sur cobayes (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) et (si possible) sur l'homme sont disponibles pour chaque substance, et
- ces substances sont disponibles dans le commerce.

La liste des produits chimiques de référence recommandés est présentée dans le tableau 1. Les études utilisant les produits chimiques de référence proposés sont mises en œuvre avec le véhicule correspondant indiqué sur la liste du tableau 1. Si l'une des substances de référence de la liste n'est pas disponible, il est possible de recourir à d'autres substances répondant aux critères de sélection susmentionnés, en justifiant la démarche de manière appropriée.

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour les normes de performance ELGL

Numéro	Produit chimique ⁽¹⁾	N° CAS	État	Véh ⁽²⁾	CE3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5 x CE3 - 2,0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
1	5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMI)/2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AHO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-phénylènediamine	106-50-3	Sol	AHO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	chlorure de cobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	isoeugénol	97-54-1	Liq	AHO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	Liq	AHO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AHO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	eugénol	97-53-0	Liq	AHO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	benzoate de phényle	93-99-2	Sol	AHO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	alcool cinnamique	104-54-1	Sol	AHO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinylurée	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	méthacrylate de méthyle	80-62-6	Liq	AHO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	chlorobenzène	108-90-7	Liq	AHO	25	1	n.a.	n.a.	-/-	-/ (*)
15	isopropanol	67-63-0	Liq	AHO	50	1	n.a.	n.a.	-/-	-/+

▼ M3

Numéro	Produit chimique (1)	N° CAS	État	Véh (2)	CE3 % (3)	N (4)	0,5 x CE3 - 2,0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
16	acide lactique	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	n.a.	n.a.	-/-	-/ (*)
17	salicylate de méthyle	119-36-8	Liq	AHO	20	9	n.a.	n.a.	-/-	-/-
18	acide salicylique	69-72-7	Sol	AHO	25	1	n.a.	n.a.	-/-	-/-
Substances facultatives démontrant une amélioration des performances par rapport à l'ELGL										
19	sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liq	MEC	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	xylène	1330-20-7	Liq	AHO	95,8	1	47,9-100	NC	+/(**)	+/-
22	chlorure de nickel	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	n.a.	n.a.	-/+	-/+

Abréviations: AHO = acétone/huile d'olive (4:1, v/v); N° CAS = Numéro attribué par le Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-diméthylformamide; DMSO = diméthylsulfoxyde; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzène; CE3 = concentration estimée nécessaire pour produire un indice de stimulation de 3; cobaye = résultats obtenus sur cobayes (d'après B.6 ou la LD 406 de l'OCDE) (13); HCA = hexyl cinnamaldéhyde; Liq = liquide; ELGL = résultats sur murins de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (d'après B.42 ou la LD 429 de l'OCDE) (1); MEC = méthyléthylcétone; n.a. = non applicable puisque l'indice de stimulation est inférieur à 3; NC = non calculée puisque les données proviennent d'une seule étude; Sol = solide; Véh = véhicule d'essai.

(*) Supposé non sensibilisant chez l'homme, dans la mesure où: on ne repère aucun résultat d'essai clinique épicutané; le produit n'est pas compris dans les kits de test épicutané des allergènes; on ne trouve aucun rapport de cas faisant état d'une sensibilisation chez l'homme.

(**) Données sur cobayes indisponibles.

(1) Les produits chimiques sont préparés chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'on peut les stocker.

(2) En raison de l'impact éventuel des différents véhicules sur la performance de l'ELGL, il convient d'utiliser le véhicule recommandé pour chaque produit chimique de référence (24) (32).

(3) Il s'agit d'une valeur moyenne lorsque plusieurs CE3 sont disponibles. Pour les substances négatives (indice de stimulation < 3), la concentration maximale de l'essai est fournie.

(4) Nombre d'études ELGL dont découlent les données.

(5) Disponible dans le commerce sous forme de Kathon CG (N° CAS 55965-84-9), un mélange de CMI et MI à 3:1. Les concentrations relatives de ces composés sont situées entre 1,1 % et 1,25 % pour la CMI, 0,3 % et 0,45 % pour la MI. Les composés inactifs sont des sels de magnésium (21,5 % à 24 %) et le nitrate de cuivre (0,15 % à 0,17 %), le reste de la formulation étant constitué de 74 % à 77 % d'eau. Le Kathon CG est disponible chez Sigma-Aldrich et Rohm and Haas (devenu Dow Chemical Corporation).

▼ M3**III. Normes de fiabilité et de précision**

7. La précision d'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée se doit d'égaliser au moins les minima des normes ELGL dans le cadre d'une évaluation effectuée à l'aide des 18 produits chimiques de référence au minimum à utiliser. La méthode d'essai modifiée ou nouvelle devrait permettre de classer correctement les substances comme étant positives ou négatives. Cependant, elle ne devrait pas forcément permettre de classer comme il convient l'ensemble des 18 produits chimiques de référence au minimum à utiliser. Si, par exemple, l'un des sensibilisants légers est mal classé, l'essai pourra toutefois être considéré comme présentant des performances équivalentes à condition de fournir les raisons expliquant cette conclusion erronée, ainsi que des données supplémentaires pertinentes (par exemple des résultats corrects obtenus pour d'autres substances dont les propriétés physiques, chimiques et sensibilisantes sont analogues à celles du produit chimique de référence). Dans ces conditions, la validation d'une telle méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle fera l'objet d'un examen au cas par cas.

Reproductibilité intralaboratoire

8. La reproductibilité intralaboratoire d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide d'un sensibilisant bien caractérisé par ELGL. En conséquence, les normes de performance de l'ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats obtenus lors d'essais répétés avec de l'hexyl cinnamaldéhyde (HCA). La reproductibilité intralaboratoire est évaluée par comparaison des concentrations estimées minimales (CEm) obtenues avec l'HCA lors de quatre essais répétés à intervalles d'une semaine au moins. Cette reproductibilité intralaboratoire est jugée acceptable lorsqu'un laboratoire parvient à obtenir des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA, ce qui correspond à 0,5-2,0 fois la CE3 moyenne spécifiée pour l'HCA (10 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

Reproductibilité interlaboratoires

9. La reproductibilité interlaboratoires d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide de deux sensibilisants bien caractérisés par ELGL. Les normes ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats d'essais effectués sur l'HCA et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) dans différents laboratoires. Les CEm respectives découlent d'études individuelles menées dans au moins trois laboratoires séparés. La reproductibilité interlaboratoires est jugée acceptable lorsque chaque laboratoire obtient des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA et entre 0,025 % et 0,1 % pour le DNCB, ce qui correspond à 0,5-2,0 fois la CE3 moyenne spécifiée respectivement pour l'HCA (10 %) et le DNCB (0,05 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

▼ **M3***Appendice 2***Définitions**

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Concentration estimée minimale (CE_m): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire un indice de stimulation indiquant une réponse positive.

Concentration estimée trois (CE₃): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire une réponse correspondant à un indice de stimulation égal à trois.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (14).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (14).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (14).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Méthode d'essai protégée: méthode d'essai dont la fabrication et la distribution sont protégées par des brevets, droits d'auteur, marques, etc.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (14).

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: i) les éléments essentiels de la méthode d'essai; ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée; et iii) les niveaux de précision et de fiabilité, similaires à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (14).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (14).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (14).

Produits chimiques de référence: produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence in vitro ou in vivo ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels elle est conçue, qu'elles soient fortes, faibles ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (14).

▼ M3

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Une telle méthode d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (14).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (14).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (14).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon doit posséder les propriétés suivantes: i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables; ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances testées; iii) posséder des caractéristiques physico-chimiques connues; iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼B**B.43. ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CHEZ LES RONGEURS****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 424 (1997) de l'OCDE.

Cette méthode d'essai a été conçue dans le but de recueillir des données permettant de confirmer ou de mieux caractériser la neurotoxicité potentielle d'une substance pour des animaux adultes. Elle peut être utilisée en association avec d'autres méthodes d'essai dans le cadre d'études de toxicité à dose répétée ou seule, en tant qu'étude indépendante. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies d'essais en matière de neurotoxicité (1). Cette recommandation est particulièrement importante lorsqu'on envisage de s'écarter des observations et des protocoles d'essai préconisés dans cette méthode. Le document d'orientation est également utile pour choisir un protocole d'essai adapté à un cas spécifique.

L'évaluation de la neurotoxicité développementale n'est pas l'objet de la présente méthode.

1.1. INTRODUCTION

Dans l'évaluation des propriétés toxiques d'un produit chimique, il est important de prendre en considération la possibilité d'effets neurotoxiques. La méthode d'essai concernant la toxicité systémique à dose répétée permet déjà un premier tri des substances potentiellement neurotoxiques. La présente méthode peut être utilisée pour obtenir des informations complémentaires sur les effets neurotoxiques observés dans les études de toxicité systémique à dose répétée, et éventuellement pour confirmer ces effets. Cependant, la neurotoxicité potentielle de substances appartenant à certaines catégories pourra être évaluée de façon plus appropriée en appliquant directement la présente méthode, sans recueillir au préalable les indications qui peuvent être fournies par les études de toxicité systémique à dose répétée. Ce sera notamment le cas lorsque:

- des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée, ou
- lorsque les substances présentent des similitudes de structure ou ont d'autres caractéristiques en commun avec des substances neurotoxiques connues.

Cette méthode peut aussi être utile dans d'autres cas; voir référence (1) pour plus de détails.

Cette méthode a été conçue de manière à pouvoir être adaptée, en fonction des besoins spécifiques, aussi bien pour confirmer la neurotoxicité histopathologique d'une substance chimique ou sa neurotoxicité sur le plan du comportement que pour caractériser et quantifier les neurotoxiques.

▼B

Autrefois, la neurotoxicité était assimilée à une forme de neuropathie englobant des lésions neuropathologiques ou des dysfonctionnements neurologiques tels que apoplexie, paralysie ou tremblements. Bien que la neuropathie soit une manifestation importante de la neurotoxicité, il apparaît aujourd'hui clairement qu'il existe de nombreux autres signes de toxicité pour le système nerveux (par exemple, perte de la coordination motrice, déficits sensoriels, diminution de la faculté d'apprentissage et de la mémoire) qui ne sont pas toujours mis en évidence par les études neuropathologiques ou autres.

La présente méthode d'essai de neurotoxicité vise à détecter, chez les rongeurs adultes, les effets importants sur le comportement et les effets neuropathologiques. Bien que des effets sur le comportement, même s'ils ne sont pas accompagnés de changements morphologiques, puissent révéler un impact néfaste sur l'organisme, les changements de comportement ne sont pas tous spécifiques du système nerveux. Par conséquent, tout changement observé doit être évalué par rapport aux données histopathologiques, hématologiques ou biochimiques correspondantes et aux résultats d'autres études de toxicité systémique. Les essais préconisés par la présente méthode pour caractériser et quantifier les réponses neurotoxiques comprennent des procédures histopathologiques et des procédures spécifiquement axées sur le comportement, qui pourront être étayées par des études électrophysiologiques et/ou biochimiques (1) (2) (3) (4).

Les agents neurotoxiques peuvent agir sur différentes cibles dans le système nerveux, et cela par différents mécanismes. Comme il est impossible de concevoir une seule série d'essais permettant d'évaluer de manière approfondie le potentiel neurotoxique de toutes les substances, il peut s'avérer nécessaire de mettre en œuvre d'autres essais *in vivo* ou *in vitro* spécifiques du type de neurotoxicité observé ou escompté.

La présente méthode d'essai peut également servir, en association avec le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies et les méthodes d'essais en matière de neurotoxicité, à concevoir des études destinées à mieux caractériser la relation dose-effet ou à améliorer la sensibilité, en vue d'obtenir une meilleure estimation de la concentration sans effet nocif observé ou de mettre en évidence les dangers connus ou suspectés de la substance. On peut ainsi concevoir des études pour identifier et évaluer le ou les mécanisme(s) neurotoxiques ou pour compléter des données déjà fournies par l'application de protocoles de base d'observations du comportement et d'observations neuropathologiques. Lors de ces études, il est inutile de chercher à obtenir en double des données qui seraient de toute façon obtenues en suivant les protocoles préconisés par cette méthode, si ces données sont déjà disponibles et ne sont pas nécessaires pour l'interprétation des résultats de l'étude.

Les informations recueillies dans cette étude de neurotoxicité, qu'elle soit réalisée de façon indépendante ou couplée à d'autres études, permettent de:

- déterminer si les effets de la substance chimique sur le système nerveux sont permanents ou réversibles,
- mieux caractériser les altérations du système nerveux qui sont liées à l'exposition à la substance et faciliter la compréhension du mécanisme sous-jacent,

▼B

- déterminer les relations entre dose et effet et entre temps et effet afin de pouvoir estimer la concentration sans effet nocif observé (laquelle pourra servir à établir les critères de sécurité de la substance).

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. Si d'autres voies, comme la voie dermique ou l'inhalation, paraissent plus appropriées, des modifications des procédures recommandées s'imposent. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles.

1.2. DÉFINITIONS

Effet nocif: toute altération par rapport à une situation de référence, qui est due au traitement et qui diminue l'aptitude d'un organisme à survivre, à se reproduire ou à s'adapter à l'environnement.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids (g, mg) de substance d'essai ou en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg) ou en concentration dans le régime (ppm).

Dosage: un terme général qui comprend la dose, la fréquence et la durée de l'administration.

Neurotoxicité: une altération de la structure ou de la fonction du système nerveux qui est la conséquence d'une exposition à un agent chimique, biologique ou physique.

Agent neurotoxique: tout agent chimique, biologique ou physique capable d'induire une neurotoxicité.

CSENO: concentration maximale dans effet nocif observé, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif imputable au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de rongeurs. L'administration se fait généralement à doses répétées sur une période qui peut être de 28 jours, de 90 jours (étude subchronique) ou d'une année ou plus (étude chronique). Les procédures décrites dans cette méthode peuvent également être appliquées dans le cas d'une étude de neurotoxicité aiguë. Les animaux sont soumis à l'essai afin de détecter ou de caractériser des anomalies de comportement ou d'ordre neurologique. Au cours de chaque période d'observation, différents aspects du comportement qui pourraient être indicatifs d'une atteinte neurotoxique sont évalués. À la fin de l'essai, une partie des animaux de chaque groupe et de chaque sexe sont perfusés in situ et des coupes du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs périphériques sont préparées et examinées.

Lorsque l'étude est conduite de façon indépendante pour dépister une neurotoxicité ou caractériser des effets neurotoxiques, les animaux de chaque groupe qui ne sont pas utilisés pour la perfusion et l'examen histopathologique (voir tableau 1) peuvent servir pour des examens du comportement et des examens neuropathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques qui permettent de compléter les données recueillies dans les observations de base préconisées par la présente méthode (1). Ces examens complémentaires peuvent être particulièrement utiles lorsque des observations empiriques ou des effets escomptés laissent prévoir un type spécifique de neurotoxicité ou une cible spécifique pour cette neurotoxicité. Une autre possibilité est d'utiliser les animaux restants dans des évaluations telles que celles qui sont préconisées par les méthodes d'essai de toxicité à doses répétées chez les rongeurs.

▼B

Lorsque les procédures de la présente méthode d'essai sont combinées avec celles d'autres méthodes, il faut prévoir un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir effectuer les observations requises par les deux études.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**1.4.1. Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées moyennant justification du choix. Il convient de recourir aux souches couramment utilisées en laboratoire. Les animaux doivent être adultes, jeunes et sains. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration des doses doit débiter aussitôt après le sevrage, de préférence avant que les animaux n'atteignent l'âge de six semaines et en tout état de cause avant neuf semaines. Cependant, lorsque la présente étude est couplée à d'autres études, cette limite d'âge peut faire l'objet d'un ajustement. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne doivent pas dépasser plus ou moins 20 % du poids moyen des animaux du même sexe. Si une étude de toxicité orale à dose répétée de faible durée est réalisée en tant qu'essai préliminaire avant une étude à long terme, il faut utiliser des animaux de même souche et de même provenance dans les deux études.

1.4.2. Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les bruits forts intermittents doivent être réduits au minimum. Pour l'alimentation des animaux, on pourra utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Le choix du régime 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 peuvent être placés dans des cages soit individuellement, soit par petits groupes du même sexe.

1.4.3. Préparation des animaux

Des animaux jeunes et sains sont choisis au hasard pour être répartis entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de manière à minimiser les effets possibles dus à l'agencement des cages. Les animaux sont marqués individuellement afin de permettre leur identification. Ils sont maintenus dans les cages pendant cinq jours au moins avant le début de l'étude pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.4. Voies d'administration et préparation des doses

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. La substance à tester peut être administrée par gavage ou en capsules ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson. D'autres voies d'administration (par exemple voie dermique ou inhalation) peuvent être utilisées, mais nécessiteront le cas échéant des modifications du mode opératoire. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles. Le choix de la voie d'administration ainsi que les éventuelles modifications du mode opératoire doivent être justifiés.

▼B

Si nécessaire, la substance d'essai peut être dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé de privilégier les solutions ou suspensions aqueuses. À défaut, on peut utiliser une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple) et, en dernier recours, une solution dans d'autres véhicules. Lorsque le véhicule n'est pas aqueux, il faut en connaître les propriétés toxiques. D'autres caractéristiques du véhicule peuvent avoir de l'importance, notamment des éventuels effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, pouvant agir sur les propriétés toxiques de celle-ci, et des effets sur la consommation de nourriture ou d'eau ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5. MODE OPÉRATOIRE**1.5.1. Nombre et sexe des animaux**

Lorsqu'il s'agit d'une étude indépendante, il faut utiliser au moins vingt animaux (dix femelles et dix mâles) dans chaque groupe de traitement et dans chaque groupe témoin pour les observations cliniques et fonctionnelles. À la fin de l'étude, au moins cinq mâles et cinq femelles sont prélevés parmi ces dix mâles et ces dix femelles pour être perfusés in situ et soumis à un examen neuro-histopathologique. Lorsque dans un groupe de dosage, les observations visant à détecter les effets neurotoxiques ne sont réalisées que sur un nombre limité d'animaux, il convient que ces animaux fassent partie de ceux qui seront choisis pour être perfusés. Si l'étude est combinée avec une étude de toxicité à doses répétées, le nombre des animaux doit être suffisant pour que les objectifs des deux études puissent être atteints. Le tableau 1 donne les nombres minimaux d'animaux par groupe pour différentes combinaisons d'études. S'il est prévu de sacrifier des animaux avant le terme de l'étude ou de constituer des groupes pour observer la réversibilité des effets, leur persistance ou l'apparition différée d'effets toxiques après traitement, ou si des observations complémentaires sont envisagées, il faut augmenter le nombre d'animaux pour s'assurer que le nombre requis pour les observations et les examens histopathologiques sera disponible.

1.5.2. Groupes de traitement et groupes témoins

En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes d'animaux traités et d'un groupe témoin. Cependant, s'il ressort de l'évaluation d'autres données qu'aucun effet n'est à attendre d'une administration répétée à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, on peut procéder à un essai limite. Si l'on ne dispose pas de données adéquates, on peut mener une étude préliminaire visant à délimiter la gamme des niveaux de doses à utiliser. À l'exception de l'exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités exactement de la même manière que les animaux des groupes de traitement. Si la substance à tester est incorporée dans un véhicule, le groupe témoin doit en recevoir un volume égal au plus grand volume utilisé dans les groupes de traitement.

1.5.3. Contrôle de la fiabilité

Le laboratoire chargé de l'étude doit présenter des données attestant de sa capacité à réaliser l'étude et prouvant la sensibilité des méthodes employées. Ces données doivent constituer une preuve évidente de la faculté du laboratoire à détecter et, le cas échéant, à quantifier les changements observés pour les différents critères d'évaluation, notamment réactions neurovégétatives, réactivité sensorielle, force de préhension et activité motrice. Les références 2 à 9 contiennent des informations sur les substances qui provoquent différents types de réponses neurotoxiques et qui peuvent servir de témoins positifs. Des données antérieures peuvent également être utilisées à condition que les principaux éléments des procédures expérimentales soient restés les mêmes. Des mises à jour périodiques de ce type de données sont recommandées. Chaque fois que le laboratoire modifie un élément essentiel du mode opératoire ou des méthodes employées, de nouvelles données doivent être réunies pour démontrer que la sensibilité des procédures est maintenue.

▼B**1.5.4. Choix des doses**

Les niveaux de dose doivent être choisis en fonction des données disponibles concernant la toxicité et la toxico-cinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. La dose la plus élevée est choisie dans le but de provoquer des effets neurotoxiques ou des effets de toxicité systémique manifeste. Il faut ensuite choisir une série de doses décroissantes de façon à mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et l'absence d'effets nocifs observables au niveau de la dose la plus faible (CSENO). En principe, les niveaux de doses doivent être choisis de telle manière que l'on puisse distinguer les effets neurotoxiques primaires des effets liés à la toxicité systémique. Deux à trois intervalles entre niveaux successifs représentent fréquemment la meilleure solution et il est souvent préférable d'ajouter un quatrième groupe d'essai plutôt que de fixer des intervalles trop espacés (par exemple dépassant un facteur dix) entre les niveaux de dose. Lorsque des estimations réalistes de l'exposition humaine existent, il faut en tenir compte.

1.5.5. Essai limite

Si une étude réalisée à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour selon la méthode décrite ci-dessus ne provoque aucun effet toxique observable, et que d'après les données obtenues pour des composés de structure analogue il est peu probable que la substance testée soit toxique, on peut considérer qu'il est inutile d'effectuer une étude complète sur trois niveaux de dose. En fonction de l'exposition humaine escomptée, il pourra s'avérer nécessaire d'administrer une dose plus forte par voie orale pour l'essai limite. Pour les autres voies d'administration, comme l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physiques et chimiques de la substance qui déterminent le niveau d'exposition maximal. Dans le cas d'une étude orale aiguë, la dose de l'essai limite doit être au moins 2 000 mg/kg.

1.5.6. Administration des doses

La substance à tester est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours par semaine, sur une période d'au moins 28 jours. L'administration à raison de cinq jours par semaine ou l'adoption d'une période d'exposition plus courte demandent à être justifiées. Lorsque la substance 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. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel. Toutefois, dans le cas d'une solution aqueuse, il est possible d'utiliser jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite pour les substances irritantes ou corrosives, qui donneraient normalement lieu à des effets fortement amplifiés à des concentrations plus élevées, il convient de minimiser les variations du volume administré en ajustant la concentration de façon à maintenir un volume constant à tous les niveaux de dose.

Lorsque la substance est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il importe que les quantités de substance utilisées ne modifient pas les bilans nutritionnels ou hydriques normaux. Lorsque la substance est administrée dans la nourriture, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante (exprimée en ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. L'option choisie doit être précisée. Lorsque la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à la même heure et la quantité doit être ajustée de manière à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'un essai à dose répétée sert d'étude préliminaire à une étude à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études. Pour les études de toxicité aiguë, si la dose ne peut être administrée en une seule fois, il est possible de la fractionner sur période n'excédant pas 24 heures.

▼B

1.6. OBSERVATIONS

1.6.1. **Fréquence des observations et essais**

Dans les études à doses répétées la période d'observation doit s'étendre sur toute la période de traitement. Dans les études de toxicité aiguë, les observations sont poursuivies pendant 14 jours après le traitement. Les animaux de groupes satellites (qui ne sont pas exposés pendant une certaine période après le traitement) sont observés également pendant 14 jours.

Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour favoriser la détection de toute anomalie de comportement ou d'ordre neurologique. Les observations se font de préférence aux mêmes moments chaque jour, en tenant compte de la période au cours de laquelle les effets escomptés du traitement seront les plus marqués. Le tableau 2 récapitule la fréquence des observations cliniques et des tests fonctionnels. Si des données de cinétique et autres, obtenues dans des études antérieures, indiquent que d'autres moments de la journée sont plus propices aux observations, essais ou observations après traitement, il y a lieu d'adopter un échancier différent afin de recueillir le plus d'informations possible. Les modifications de l'échancier doivent être justifiées.

1.6.1.1. *Surveillance de l'état de santé général et relevés de mortalité/morbidité*

Tous les animaux font l'objet d'un examen minutieux au moins une fois par jour pour vérifier leur état de santé, et des relevés de la morbidité et de la mortalité sont effectués au moins deux fois par jour.

1.6.1.2. *Observations cliniques détaillées*

Tous les animaux choisis pour être soumis à un examen clinique approfondi (voir tableau 1) subissent cet examen une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même individu) et à divers intervalles par la suite, en fonction de la durée de l'étude (voir tableau 2). Les groupes satellites destinés à l'observation de la réversibilité des effets sont examinés à la fin de la période de récupération. Ces examens doivent être effectués hors de la cage habituelle, sur une aire standard. Les résultats doivent être soigneusement consignés, de préférence à l'aide de systèmes de cotation utilisant des critères ou d'échelles de cotation, pour chaque mesure effectuée. Les critères ou échelles employés doivent être explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai (mis à part celles qui sont liées au traitement) et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs expérimentés n'ayant pas connaissance du traitement administré.

Il est recommandé de procéder de manière structurée en appliquant systématiquement, pour chaque animal et à chaque moment d'observation, des critères bien définis. Les données utilisées pour définir le niveau normal doivent être présentées. Tous les signes observés doivent être consignés. L'ampleur des signes observés est également consignée chaque fois que cela est possible. Les observations cliniques devraient notamment porter sur les modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives (sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, rythme respiratoire inhabituel, respiration par la bouche, tous signes inhabituels de miction ou défécation, urine décolorée, par exemple).

▼B

Il convient également de consigner toute réaction inhabituelle en ce qui concerne la position du corps, le niveau d'activité (par exemple exploration accrue ou diminuée de l'aire standard) et la coordination des mouvements. Il convient également de consigner les modifications dans la démarche (dandinement, ataxie, par exemple), dans la posture (dos arrondi, par exemple) et la réaction à la manipulation, au placement et autres stimuli, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, les convulsions et tremblements, les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou les comportements bizarres (par exemple, tendance à mordre, léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation) ou l'agressivité.

1.6.1.3. *Tests fonctionnels*

Comme dans le cas des observations cliniques, les tests fonctionnels sont réalisés sur tous les animaux sélectionnés à cet effet (voir tableau 1) une fois avant l'exposition et fréquemment ensuite. La fréquence des tests fonctionnels dépend également de la durée de l'étude (voir tableau 2). En plus des périodes d'observation stipulées dans le tableau 2, des observations fonctionnelles sont réalisées sur des groupes satellites aussi près que possible du sacrifice final. Les tests fonctionnels explorent notamment la réactivité sensorielle à divers stimuli [par exemple, stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs (5) (6) (7)], la force de préhension (8) et l'activité motrice (9). Cette dernière doit être mesurée à l'aide d'un dispositif automatique pouvant détecter aussi bien les hausses que les baisses d'activité. Si un autre système défini est utilisé, il doit être quantitatif et de sensibilité et de fiabilité démontrées. Chaque dispositif doit être testé afin de garantir sa fiabilité au cours du temps et la cohérence des résultats d'un dispositif à l'autre. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. En l'absence d'informations sur le potentiel neurotoxique (par exemple, informations sur la relation structure-activité, données épidémiologiques, autres études toxicologiques), il convient d'envisager des tests plus spécialisés d'exploration des fonctions sensorielles et motrices ou de la mémoire et de la faculté d'apprentissage. La référence (1) fournit de plus amples informations sur les tests plus spécialisés et leur utilisation.

Exceptionnellement, les animaux qui montrent des signes de toxicité marqués qui risqueraient de fausser considérablement les résultats du test fonctionnel peuvent ne pas être soumis à ce test. La décision d'écarter des animaux d'un test fonctionnel doit être justifiée.

1.6.2. **Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau**

Dans les études allant jusqu'à 90 jours, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. Il faut également mesurer la quantité de nourriture consommée (ou d'eau consommée, lorsque la substance est administrée par cette voie), au moins une fois par semaine. Dans les études à long terme, tous les animaux sont pesés au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et au moins une fois toutes les quatre semaines par la suite. La quantité de nourriture consommée (ou d'eau, si la substance est administrée par cette voie) doit être mesurée au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et à peu près tous les trois mois par la suite, à moins qu'une détérioration de l'état général ou un amaigrissement n'imposent d'autres conditions.

▼B**1.6.3. Ophtalmologie**

Dans les études de plus de 28 jours, un examen ophtalmologique à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié doit être effectué avant l'administration de la substance et au terme de l'étude. Cet examen est effectué de préférence sur tous les animaux et en tout état de cause au moins sur ceux du groupe ayant reçu la dose la plus forte ainsi que sur les animaux des groupes témoins. Si des altérations sont détectées dans les yeux, ou si des signes cliniques y incitent, l'examen est étendu à tous les animaux. Dans les études à long terme, un examen ophtalmologique est prévu après treize semaines. Des examens ophtalmologiques ne sont pas nécessaires si les informations pertinentes ont déjà été fournies par d'autres études de durée similaire réalisées à des doses comparables.

1.6.4. Hématologie et biochimie clinique

Lorsque l'étude de neurotoxicité est conduite en combinaison avec une étude de toxicité systémique à doses répétées, les examens hématologiques et les déterminations de biochimie clinique doivent être effectués comme prescrit par la méthode correspondante de l'étude de toxicité systémique. Les échantillons sont à prélever de telle façon que les effets possibles sur le comportement neurologique soient réduits au minimum.

1.6.5. Histopathologie

L'examen neuropathologique doit être conçu dans le but de compléter et d'approfondir les observations faites pendant la phase in vivo de l'étude. Les tissus d'au moins cinq animaux de chaque sexe et de chaque groupe (voir le tableau 1 et le paragraphe suivant) doivent être fixés in situ à l'aide des techniques de perfusion et de fixation usuelles (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Tout changement important observable doit être consigné. S'il s'agit d'une étude indépendante, réalisée pour dépister une neurotoxicité ou pour caractériser des effets neurotoxiques, les animaux restants peuvent être utilisés pour des examens spécifiques du comportement neurologique (10) (11), des examens neuropathologiques (10) (11) (12) (13), neurochimiques (10) (11) (14) (15) ou électrophysiologiques (10) (11) (16) (17) pouvant éventuellement compléter les procédures et examens décrits ici, ou bien venir s'ajouter aux animaux soumis à l'examen histopathologique. Ces procédures complémentaires sont particulièrement utiles lorsque, à la suite d'observations empiriques ou sur la base des effets escomptés, on peut s'attendre à un type spécifique de neurotoxicité ou à une cible spécifique de celle-ci (2) (3). Ces animaux restants peuvent également servir dans les évaluations pathologiques de routine qui sont décrites dans la méthode à doses répétées.

Les échantillons de tissus sont colorés par une méthode usuelle, par exemple par de l'hématoxyline et de l'éosine, inclus dans de la paraffine et examinés sous le microscope. Si des signes de neuropathie périphérique sont observés ou en cas de suspicion de tels effets, il conviendra d'examiner des échantillons de tissu nerveux périphérique inclus dans du plastique. Certains signes cliniques peuvent également inciter à l'examen d'autres sites ou à l'utilisation de méthodes de coloration spéciales. Les références (3) et (4) fournissent des indications sur les sites supplémentaires à examiner. Des colorants spéciaux peuvent aussi être utiles pour mettre en évidence des types spécifiques d'altérations pathologiques (18).

▼B

Un examen histologique doit être réalisé sur des coupes représentatives du système nerveux central et périphérique (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Les sites examinés doivent normalement comprendre le cerveau antérieur, le centre des hémisphères cérébraux, comprenant une coupe de l'hippocampe, le cerveau central, le cervelet, la protubérance annulaire, le bulbe rachidien, l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière et les renflements cervicaux et lombaires, les ganglions de la chaîne dorsale, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au genou) et les ramifications du nerf tibial aux muscles du mollet. Les sections de la moelle épinière et des nerfs périphériques doivent comprendre des coupes transversales et longitudinales. Il faut accorder une attention particulière à la vascularisation du système nerveux. Un échantillon de muscles squelettiques, en particulier du mollet, devrait également être examiné. Une attention particulière devrait être accordée aux régions à structure cellulaire et fibreuse du système nerveux central et périphérique, qui sont connues pour être particulièrement sujettes aux attaques neurotoxiques.

Les références (3) et (4) fournissent des informations sur les altérations neuropathologiques typiquement liées aux expositions à une substance neurotoxique. Il est recommandé de procéder par étapes pour l'examen des échantillons de tissus, en comparant d'abord des coupes du groupe ayant reçu la forte dose avec des coupes du groupe témoin. Si aucune altération neuropathologique n'est constatée dans les échantillons de ces groupes, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'analyse. Si des altérations neuropathologiques apparaissent dans le groupe traité à la forte dose, il faut alors examiner successivement des échantillons de tous les tissus potentiellement affectés des groupes traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

Si l'examen qualitatif met en évidence des signes d'altérations neuropathologiques, il convient de procéder à un second examen de toutes les régions du système nerveux qui présentent ces altérations. Dans tous les groupes de dosage, il convient de réaliser des coupes de toutes les régions potentiellement affectées, qui seront ensuite codées, puis examinées à l'aveugle dans un ordre aléatoire. La fréquence et la gravité de chaque lésion sont consignées. Quand toutes les régions de tous les groupes ont été cotées, le code est cassé et une analyse statistique est faite afin de déterminer la relation dose-réponse. Il faut donner la description des différents degrés de gravité de chaque lésion.

Les résultats de l'examen neuropathologique doivent être évalués à la lumière des observations et déterminations fonctionnelles, ainsi que des résultats des études de toxicité systémique réalisées sur la substance.

2. **RÉSULTATS**

2.1. **TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

Il faut présenter les résultats relatifs à chaque individu. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux montrant pour chaque groupe d'essai ou groupe témoin le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés au cours de l'essai, le moment de chaque décès ou sacrifice, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, une description de ces signes, y compris le moment de leur apparition, leur durée, leur type et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, le type de ces dernières et leur gravité.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude doivent être évalués sur les plans de la fréquence, de la gravité et de la corrélation des effets neuropathologiques et de comportement (le cas échéant, neurochimiques et électrophysiologiques si des examens supplémentaires ont été pratiqués) avec d'autres effets nocifs observés. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique adéquate et communément acceptée. Les méthodes statistiques doivent être choisies au moment de la conception de l'étude.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après:

Substance d'essai:

- nature physique (y compris isomérisation, pureté et propriétés physico-chimiques),
- données permettant l'identification.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.,
- source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.

Conditions de l'essai:

- description détaillée de la formulation de la substance à tester et/ou de la préparation alimentaire, concentration atteinte, stabilité et homogénéité de la préparation,
- précisions sur les doses administrées, le véhicule, le volume et la forme physique du mélange administré,
- précisions sur le mode d'administration de la substance à tester,
- justification du choix des niveaux de dose,
- justification du choix de la voie et de la durée d'exposition,
- conversion de la concentration (en ppm) de la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson en dose (en mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant,
- précisions sur la qualité des aliments et de l'eau.

Procédures d'observation et d'essais:

- précisions sur l'affectation des animaux de chaque groupe aux sous-groupes de perfusion,
- précisions sur les systèmes de cotation, les critères et les échelles utilisés pour chaque détermination lors des observations cliniques détaillées,

▼B

- précisions sur les tests fonctionnels d'exploration de la réactivité sensorielle à divers stimuli (par exemple stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs); précisions sur l'évaluation de la force de préhension; précisions sur l'évaluation de l'activité motrice (y compris détails sur les dispositifs automatiques de détection de l'activité) et sur les autres procédures,
- précisions sur les examens ophtalmologiques et, le cas échéant, hématologiques et sur les tests de biochimie clinique, avec indication des valeurs de référence,
- précisions sur les procédures spécifiques de recherche des modifications du comportement et des altérations neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques.

Résultats:

- poids corporel/variations du poids corporel et poids au moment du sacrifice,
- consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant,
- informations sur les réactions de toxicité, par sexe et par niveau de dose, y compris les symptômes de toxicité ou mortalité,
- nature, gravité et durée (moment du début et évolution observée) des observations cliniques détaillées (préciser si les effets sont réversibles ou non),
- description détaillée des résultats de tous les tests fonctionnels,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations concernant le comportement, les modifications neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques, le cas échéant,
- données concernant l'absorption et le métabolisme, si disponibles,
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Discussion des résultats:

- informations concernant la relation dose-réponse,
- rapport entre tout autre effet toxique et une conclusion quant au potentiel neurotoxique de la substance,
- concentration sans effet nocif observé.

Conclusions:

- une appréciation sur la neurotoxicité globale de la substance est demandée.

4.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris In Preparation.
- (2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
- (3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.
- (4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

▼B

- (5) Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, p. 999-1003.
- (6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, p. 691-704.
- (7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, p. 267-283.
- (8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, p. 233-236.
- (9) Crofton, K.M., Haward, J.L, Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, p. 599-609.
- (10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
- (11) Chang, L.W., ed. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
- (12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, p. 689-695.
- (13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl.Toxicol.*, 18, p. 343-352.
- (14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, p. 445-452.
- (15) O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, p. 368-378.
- (16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.
- (17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds, Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.
- (18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Tableau 1

Nombres minimaux d'animaux requis par groupe selon que l'étude de neurotoxicité est conduite séparément ou en combinaison avec d'autres études

	ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CONDUITE COMME:			
	Étude séparée	Étude combinée avec une étude sur 28 jours	Étude combinée avec une étude sur 90 jours	Étude combinée avec une étude de toxicité chronique
Nombre total d'animaux par groupe	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	15 mâles et 15 femelles	25 mâles et 25 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels, y compris les observations cliniques détaillées	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour la perfusion in situ et l'examen neurohistopathologique	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les essais de toxicité à dose répétée, de toxicité subchronique et chronique, les études hématologiques, de biochimie clinique, histopathologiques, etc., comme indiqué dans les lignes directrices correspondantes		5 mâles et 5 femelles	10 mâles † et 10 femelles †	20 mâles † et 20 femelles †
Observations complémentaires, le cas échéant	5 mâles et 5 femelles			

† Ce nombre comprend cinq animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels et les observations cliniques détaillées faisant partie de l'étude de neurotoxicité.



Tableau 2

Fréquence des observations cliniques et périodicité des tests fonctionnels

Type d'observation		Durée de l'étude			
		Étude de toxicité aiguë	28 jours	90 jours	Étude de toxicité chronique
Sur tous les animaux	État de santé général	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement
	Mortalité/morbidité	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour
Sur les animaux sélectionnés pour les observations fonctionnelles	Observations cliniques détaillées	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé — aux jours 7 et 14 après administration 	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — une fois par semaine ensuite 	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition — une fois par mois ensuite 	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — une fois à la fin du premier mois d'exposition — tous les trois mois ensuite
	Tests fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé — aux jours 7 et 14 après administration 	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — pendant la quatrième semaine du traitement le plus près possible de la fin de la période d'exposition 	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition — une fois par mois ensuite 	<ul style="list-style-type: none"> — avant la première exposition — une fois à la fin du premier mois d'exposition — tous les trois mois ensuite

▼B**B.44. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VIVO****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 427 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La voie d'exposition à de nombreux produits chimiques est essentiellement transcutanée, c'est-à-dire via la peau. Or, la majorité des études toxicologiques réalisées sur des animaux de laboratoire s'appuient sur une administration des produits par voie orale. L'étude d'absorption cutanée *in vivo* décrite dans la présente méthode offre donc les éléments nécessaires pour extrapoler les résultats des études par administration orale, lors des évaluations en matière de sécurité réalisées après exposition cutanée.

Avant de passer dans la circulation sanguine, une substance doit d'abord traverser un grand nombre de couches cellulaires de la peau. Pour la plupart des substances, c'est le stratum corneum, composé de cellules mortes, qui est la couche déterminante sur le plan cinétique. La perméabilité de la peau dépend à la fois de la lipophilicité de la substance et de l'épaisseur de la couche externe de l'épiderme, ainsi que d'autres facteurs tels que le poids moléculaire et la concentration de la substance. De manière générale, la peau des rats et des lapins est plus perméable que celle de l'homme, tandis que celle des cobayes, des porcs et des singes se rapproche de la peau humaine.

Les méthodes de mesure de l'absorption percutanée sont de deux types: *in vivo* et *in vitro*. La méthode *in vivo* fournit de bonnes informations sur l'absorption cutanée chez différentes espèces de laboratoire. Mises au point plus récemment, les méthodes *in vitro* se fondent sur le transport d'une substance à travers tout ou partie de l'épaisseur de la peau humaine ou animale jusqu'à un réservoir de fluide. La méthode *in vitro* est décrite dans une autre méthode d'essai (1). Pour choisir la méthode la mieux appropriée en fonction des situations données, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) qui examine en détails la pertinence respective des méthodes *in vivo* et *in vitro*.

La méthode *in vivo* décrite dans la présente méthode permet de déterminer que la substance d'essai a traversé la peau pour pénétrer dans le compartiment systémique. La technique est largement utilisée depuis de nombreuses années (3) (4) (5) (6) (7). Alors que les études *in vitro* d'absorption percutanée conviennent dans de nombreux cas, il existe certaines situations dans lesquelles seule une étude *in vivo* permet d'obtenir les données voulues.

Les avantages de la méthode *in vivo* sont les suivants: utilisation d'un système intact sur les plans physiologique et métabolique, utilisation d'une espèce commune à bon nombre d'études de toxicité, et possibilité de modification pour une utilisation sur d'autres espèces. En revanche, elle présente certains inconvénients: utilisation d'animaux vivants, utilisation de matière radiomarquée pour garantir la fiabilité des résultats, difficultés à déterminer la phase d'absorption précoce, et différences de perméabilité entre la peau humaine et celle des espèces les plus communément utilisées (rat). En effet, la peau animale est généralement plus perméable, ce qui peut conduire à une surestimation de l'absorption percutanée chez l'homme (6) (8) (9). Les substances caustiques et corrosives ne doivent pas être testées sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Dose non absorbée: désigne la quantité de substance éliminée par le nettoyage de la surface de la peau après exposition, et toute quantité présente sur le pansement non occlusif, y compris toute quantité volatilisée au cours de l'exposition.

Dose absorbée (in vivo): désigne les quantités de substance présentes dans l'urine, les résidus ramassés dans la cage après nettoyage, les fèces, l'air expiré (s'il est mesuré), le sang, les tissus (s'ils sont collectés) et la carcasse, après récupération de la peau du site d'application.

Dose absorbable: désigne la quantité de substance présente sur ou dans la peau après nettoyage.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai, de préférence radiomarquée, est appliquée sur la peau rasée des animaux, à la dose ou aux différentes doses appropriée(s), sous la forme d'une préparation d'usage représentative. La préparation d'essai est maintenue au contact de la peau pendant une période donnée, sous un pansement adapté (non occlusif, semi-occlusif ou occlusif) de façon à prévenir l'ingestion de la préparation. Au terme de la période d'exposition, le pansement est retiré et la peau est nettoyée à l'aide d'un agent lavant approprié. Le pansement et le matériel utilisé pour appliquer l'agent lavant sont conservés pour analyse, et un nouveau pansement est appliqué. Avant, pendant et après la période d'exposition, les animaux sont hébergés dans des cages métaboliques individuelles, et les excréments et l'air expiré au cours de ces périodes sont collectés pour analyse. Le cas échéant, si l'on dispose d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, la collecte de l'air expiré peut être omise. Normalement, chaque étude porte sur plusieurs groupes d'animaux exposés à la préparation d'essai. Un groupe est euthanasié à la fin de la période d'exposition, et les autres groupes sont euthanasiés par la suite à des intervalles déterminés (2). À la fin de la période d'échantillonnage, les animaux restants sont euthanasiés, le sang est collecté pour analyse, la zone d'application est prélevée pour analyse, et la carcasse est analysée pour rechercher toute matière non excrétée. Les échantillons sont analysés selon les méthodes appropriées et on estime le degré d'absorption percutanée (6) (8) (9).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. Sélection de l'espèce animale

Le rat est l'espèce la plus communément utilisée, mais des souches et espèces sans poils présentant un taux d'absorption cutanée plus proche de celui de l'homme peuvent aussi être utilisées (3) (6) (7) (8) (9). Des jeunes adultes sains du même sexe (mâles par défaut) d'une souche communément utilisée en laboratoire sont utilisés. Au début de l'étude, les animaux retenus ne doivent pas présenter un écart de poids de $\pm 20\%$ par rapport au poids moyen. Par exemple, des rats mâles de 200 à 250 grammes conviennent tout à fait, en particulier ceux présentant un poids dans la moitié supérieure de cette plage.

▼B**1.4.2. Nombre et sexe des animaux**

Un groupe d'au moins quatre animaux du même sexe doit être utilisé pour chaque préparation d'essai et chaque durée programmée. Chacun des groupes est euthanasié à un intervalle de temps différent, par exemple à la fin de la période d'exposition (généralement de 6 à 24 heures) et à différentes échéances suivantes (48 et 72 heures par exemple). Dans le cas où des données disponibles démontrent une différence importante de sensibilité toxicologique dermique entre les mâles et les femelles, c'est le sexe le plus sensible qu'il convient d'utiliser. En l'absence de telles données, l'un ou l'autre des sexes peut être utilisé.

1.4.3. Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local expérimental doit être de 22 °C (\pm 3 °C). Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 % sans excéder de préférence 70 %, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforce de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On applique un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux sont nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire disponible à volonté et boivent de l'eau potable à volonté. Pendant l'étude, et de préférence également pendant la phase d'acclimatation, les animaux sont placés dans des cages métaboliques individuelles. Les déversements d'eau ou de nourriture étant susceptibles de compromettre les résultats de l'étude, les risques de tels incidents doivent être minimisés.

1.4.4. Préparation des animaux

Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle, et placés dans leurs cages cinq jours au moins avant le début de l'essai, pour qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

À l'issue de la période d'acclimatation et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai, la région dorsale des épaules de chaque animal est tondue à ras. La perméabilité d'une peau endommagée étant différente de celle d'une peau saine, un soin tout particulier doit être apporté pour ne pas «égratigner» la peau. Après la tonte et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai sur la peau (voir point 1.4.7), la surface de la peau est délicatement nettoyée à l'acétone pour retirer le sébum. Il n'est pas recommandé de procéder à un nettoyage supplémentaire à l'eau et au savon dans la mesure où les résidus de savon sont susceptibles de favoriser l'absorption de la substance d'essai. La surface tondue doit être suffisamment grande pour permettre un calcul fiable de la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau, soit de préférence au moins 10 centimètres carrés. Des rats de 200 à 250 grammes sont compatibles avec une telle surface. Après préparation, les animaux sont replacés dans leurs cages métaboliques.

1.4.5. Substance d'essai

La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radio-marquée.

1.4.6. Préparation de l'essai

La préparation de 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) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation «d'usage» doit être justifiée. Le cas échéant, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adapté. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé, ses caractéristiques d'absorption et son interaction potentielle avec la substance d'essai doivent être connues.

▼B**1.4.7. Application sur la peau**

Une zone (site) d'application d'une superficie spécifique est définie sur la surface de la peau. Une quantité connue de la préparation d'essai est ensuite uniformément appliquée sur ce site. Normalement, cette quantité doit correspondre à une exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm² pour une substance solide ou jusqu'à 10 ml/cm² pour les liquides. L'application de toute autre quantité doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Après l'application, le site doit être protégé contre les frottements. La figure 1 présente un exemple de dispositif classiquement employé dans ce contexte. Généralement, on protège le site d'application par un pansement non occlusif (par exemple une compresse de gaze nylon perméable). Cela étant, pour des applications infinies, le site d'application doit être recouvert d'un pansement occlusif. Dans les cas où l'évaporation d'une substance d'essai semi-volatile réduit dans une trop grande mesure le taux de récupération de la substance d'essai (voir également le point 1.4.10, premier paragraphe), il convient de piéger la substance évaporée dans un filtre à charbon monté sur le dispositif d'application (voir la figure 1). Il est essentiel que les dispositifs d'application utilisés n'endommagent pas la peau, et qu'ils n'absorbent pas non plus la préparation d'essai ni n'entrent en réaction avec elle. Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages métaboliques individuelles pour la collecte de leurs excréments.

1.4.8. Durée de l'exposition et échantillonnage

La durée de l'exposition correspond à l'intervalle de temps entre l'application de la préparation d'essai et son retrait par nettoyage de la peau. Une période d'exposition pertinente (généralement de 6 à 24 heures) doit être retenue, en fonction de la durée éventuelle de l'exposition humaine. À l'issue de la période d'exposition, les animaux sont maintenus dans leurs cages métaboliques jusqu'au terme prévu. Pendant toute la durée de l'étude, il convient d'observer les animaux à intervalles réguliers, pour détecter tout signe de toxicité ou toute réaction anormale. Après la période d'exposition, les éventuels signes visibles d'irritation doivent être observés sur la peau traitée.

Les cages métaboliques doivent permettre la collecte séparée des fèces et de l'urine pendant toute la durée de l'étude, ainsi que la collecte du dioxyde de carbone marqué au C₁₄ et des composés volatils C₁₄ qu'il convient d'analyser lorsqu'ils sont produits en quantité (> 5 %). L'urine, les fèces et autres fluides (par exemple, le dioxyde de carbone C₁₄ et les composés volatils C₁₄) doivent être collectés individuellement pour chaque groupe et à chaque étape d'échantillonnage. Sur la base d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, on peut le cas échéant utiliser des cages ouvertes.

Les excréments sont collectés pendant la période d'exposition, soit 24 heures maximum après la première application sur la peau, puis ensuite chaque jour jusqu'à la fin de l'expérience. Si trois intervalles de collecte des excréments suffisent normalement, des points de collecte supplémentaires ou plus appropriés peuvent être définis pour une étude, selon l'objectif envisagé pour la préparation d'essai ou en fonction de données cinétiques existantes.

À la fin de la période d'exposition, le dispositif de protection est retiré de chaque animal et conservé individuellement aux fins d'analyse. La peau traitée de tous les animaux doit être nettoyée au moins trois fois à l'aide d'un agent et de tampons nettoyants appropriés. Un soin particulier doit être apporté de façon à ne pas contaminer d'autres zones du corps des animaux. L'agent lavant doit être représentatif des pratiques d'hygiène normales (par exemple une solution d'eau savonneuse). Enfin, la peau doit être séchée. Tous les tampons et matériel de nettoyage utilisés doivent être conservés pour analyse. Un nouveau pansement doit être appliqué sur le site traité des animaux formant les derniers groupes, avant leur retour dans les cages métaboliques individuelles.

▼B**1.4.9. Procédures terminales**

Pour chaque groupe, les animaux doivent être euthanasiés à l'échéance préétablie et leur sang collecté pour analyse. Le pansement ou dispositif de protection doit être retiré pour analyse. La peau du site d'application et une surface de peau équivalente mais provenant d'une zone rasée non traitée doivent être prélevées sur chaque animal, et des analyses distinctes doivent être conduites. Le cas échéant, le site d'application peut être fractionné pour séparer le stratum corneum de l'épiderme sous-jacent, de façon à fournir des informations supplémentaires sur l'évacuation et le comportement de la substance chimique d'essai. En effet, déterminer le comportement/élimination du produit au cours d'un laps de temps donné après la période d'exposition donne une indication sur le devenir de n'importe quelle substance chimique dans le stratum corneum. Pour faciliter le fractionnement de la peau (après le dernier nettoyage et l'euthanasie des animaux), il faut d'abord retirer tous les dispositifs de protection. Ensuite, on prélève la peau du site d'application sur le rat, plus une bande circulaire autour du site, puis on épingle le tout sur une planche. On applique alors, par quelques pressions légères, une bande de ruban adhésif à la surface de la peau. Cette bande est ensuite retirée, avec une partie du stratum corneum. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que la bande n'adhère plus à la surface de la peau, lorsque tout le stratum corneum a été retiré. Pour chaque animal, on peut combiner toutes les bandes d'adhésif dans un seul récipient, dans lequel on ajoute un digestif pour solubiliser le stratum corneum. Le cas échéant, on récupère tout éventuel tissu cible pour procéder à des mesures séparées, avant analyse de la carcasse résiduelle et mesure de la dose absorbée par celle-ci. Les carcasses des animaux doivent être conservées pour analyse. En règle générale, l'analyse du contenu total de la carcasse est suffisante, mais certains organes peuvent être retirés pour des analyses séparées (par exemple si cela est indiqué par d'autres études). L'urine présente dans la vessie au moment de l'euthanasie doit être ajoutée à celle collectée auparavant. Après collecte des excréments dans les cages métaboliques au moment de l'euthanasie, les cages et leurs trappes doivent être nettoyées avec un solvant approprié. Les autres équipements potentiellement contaminés doivent également être analysés.

1.4.10. Analyse

Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir une moyenne de 100 ± 10 % de la radioactivité). Les récupérations en dehors de cette plage doivent faire l'objet de justification. Le volume de la dose administrée dans chaque échantillon doit être analysé selon des procédures suffisamment validées.

L'analyse statistique doit inclure une mesure de la variance des essais répétés de chaque application.

2. RÉSULTATS

Les mesures suivantes de la substance d'essai et/ou des métabolites doivent être effectuées sur chaque animal et à chaque point d'échantillonnage. Tous les résultats doivent être présentés individuellement, mais aussi groupés par point d'échantillonnage sous forme de moyenne:

- quantité associée aux dispositifs de protection,
- quantité pouvant être récupérée de la peau,
- quantité présente sur ou dans la peau et impossible à retirer par nettoyage,

▼B

- quantité dans les échantillons de sang,
- quantité dans les excréments et l'air expiré (le cas échéant),
- quantité restant dans la carcasse et tout organe éventuellement retiré pour analyse.

Les quantités de substance d'essai et/ou de métabolites trouvées dans les excréments, l'air expiré, le sang et la carcasse permettent de déterminer les quantités totales absorbées à chaque point. À partir de ces données, on peut calculer la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau exposée à la substance au cours de la période d'exposition.

3. **RAPPORT**

3.1. **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

- données d'identification [par exemple, numéro CAS si disponible; source; pureté (pureté radiochimique); impuretés connues; numéro du lot],
- état physique; propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité, poids moléculaire et log P_{oe}).

Préparation de l'essai:

- formulation et justification de l'utilisation,
- détails de la préparation d'essai, quantité appliquée, concentration atteinte, véhicule, stabilité et homogénéité.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux utilisés,
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai:

- détails concernant l'administration de la préparation d'essai (site d'application, méthodes d'essai, occlusion/non-occlusion, volume, extraction, détection),
- détails concernant la qualité de l'eau et la nourriture.

Résultats:

- tout signe de toxicité,
- tableau indiquant les données d'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentage),

▼B

- récupérations totales de l'expérience,
- interprétation des résultats, avec comparaison avec toutes les autres données éventuellement disponibles concernant l'absorption de la substance d'essai.

Discussion des résultats

Conclusions

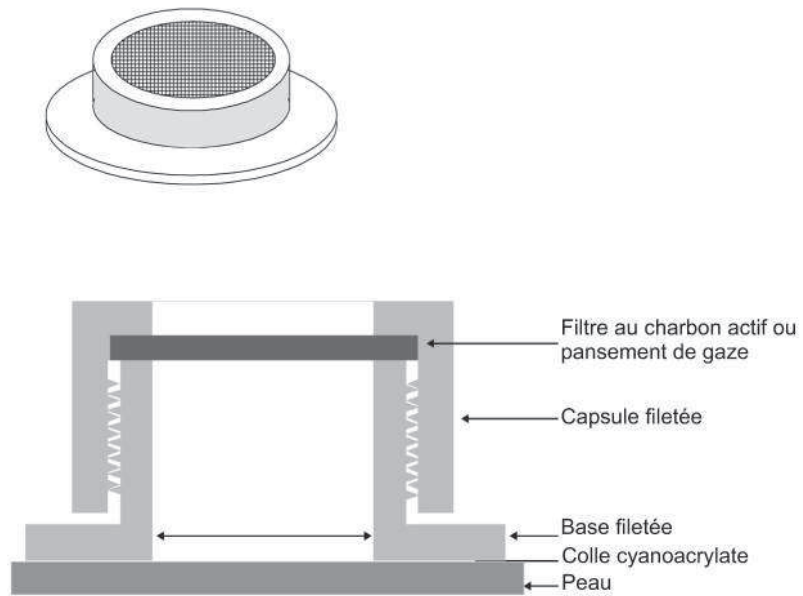
4. BIBLIOGRAPHIE

1. Méthode d'essai B.45. Absorption cutanée: méthode in vitro.
2. OCDE (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCDE, Paris.
3. ECETOC (1993). Percutaneous Absorption. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques, Monographie No 20.
4. Zendzian, RP (1989). Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll Toxicol.* 8(5), p. 829-835.
5. Kemppainen, BW, Reifenrath, WG (1990). Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
6. EPA (1992). Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
7. EPA (1998). Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
8. Bronaugh, RL, Wester, RC, Bucks, D, Maibach, HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, p. 369-373.
9. Feldman, RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54. p. 399-404.

▼B

Figure 1

Exemple de dispositif classiquement utilisé pour délimiter et protéger un site d'application cutanée au cours d'études d'absorption percutanée in vivo



▼B**B.45. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VITRO****1. MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 428 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode a été élaborée pour fournir des informations sur l'absorption d'une substance d'essai appliquée sur un échantillon de peau excisée. Elle peut être combinée à la méthode d'absorption cutanée: méthode *in vivo* (1), ou être menée séparément. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) pour élaborer des études reposant sur cette méthode. Ce document d'orientation a été préparé pour faciliter la sélection des procédures *in vitro* appropriées, utilisables selon les circonstances spécifiques, et dans le but de garantir la fiabilité des résultats obtenus avec cette méthode.

Les méthodes de mesure de l'absorption cutanée se divisent en deux grandes catégories: *in vivo* et *in vitro*. Les méthodes *in vivo* d'étude de l'absorption cutanée sont bien connues et fournissent des informations pharmacocinétiques sur un large éventail d'espèces animales. Une méthode *in vivo* est décrite dans une autre méthode d'essai (1). Les méthodes *in vitro* sont utilisées depuis de nombreuses années pour mesurer l'absorption cutanée. Même s'il n'y a pas eu d'étude de validation formelle des méthodes *in vitro* présentées dans cette méthode d'essai, les experts de l'OCDE ont estimé en 1999 que le volume des données évaluées suffisait pour étayer la méthode *in vitro* (3). Le document d'orientation de l'OCDE (2) présente des détails supplémentaires appuyant cette décision, dont un certain nombre de comparaisons directes des méthodes *in vitro* et *in vivo*. De même, de nombreuses monographies examinent cette question et offrent un contexte de référence détaillé sur l'utilisation de la méthode *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Les méthodes *in vitro* mesurent la diffusion d'une substance dans et à travers la peau jusqu'à un réservoir de fluide; elles utilisent des échantillons de peau non viable pour mesurer la diffusion seule, ou des échantillons de peau fraîche et métaboliquement active pour mesurer simultanément la diffusion et le métabolisme cutané. Ces méthodes conviennent particulièrement pour comparer l'absorption cutanée et percutanée de différentes formulations d'une substance chimique, mais elles proposent aussi des modèles utiles pour l'évaluation de l'absorption percutanée chez l'homme.

La méthode *in vitro* ne convient pas nécessairement pour toutes les situations et classes de substances, mais on peut l'utiliser pour une première évaluation qualitative de la pénétration cutanée. Dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire de compléter l'étude par des données *in vivo*. Pour des informations complémentaires sur les situations où la méthode *in vitro* conviendrait, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE (2). La référence (3) fournit d'autres précisions qui peuvent faciliter la prise de décision.

La présente méthode présente des principes généraux pour mesurer l'absorption cutanée et la diffusion d'une substance d'essai à partir d'un échantillon de peau excisée. Dans ce contexte, la peau de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, peut être utilisée. Les propriétés de perméabilité de la peau sont conservées après le prélèvement de l'échantillon de peau, dans la mesure où c'est le stratum corneum non viable qui constitue le principal obstacle à la diffusion; aucune forme de transport actif des substances chimiques à travers la peau n'a jamais été identifiée. En revanche, il a été établi que la peau pouvait métaboliser certaines substances au cours de l'absorption percutanée (6), mais ce processus ne limite pas la dose réellement absorbée, même si elle est susceptible d'affecter la nature du produit qui passe ensuite dans le sang.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Dose non absorbée: désigne la quantité retirée par nettoyage de la surface de la peau après exposition et toute quantité présente sur le timbre non occlusif, y compris toute quantité volatilisée au cours de l'exposition.

Dose absorbée (in vitro): masse de substance d'essai atteignant le fluide receveur (ou la circulation systémique) dans une période de temps donnée.

Dose absorbable (in vitro): désigne la quantité présente sur ou dans la peau après nettoyage.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai, le cas échéant radiomarquée, est appliquée à la surface d'un échantillon de peau séparant les deux chambres d'une cellule à diffusion. La substance chimique reste sur la peau pendant un temps donné et dans des conditions spécifiques, avant d'être retirée selon une procédure de nettoyage appropriée. Au cours de l'étude, on échantillonne le fluide receveur à des moments donnés, puis on l'analyse pour y rechercher la substance d'essai et/ou des métabolites.

Lorsque des systèmes métaboliquement actifs sont utilisés, les éventuels métabolites de la substance d'essai peuvent être analysés selon les méthodes appropriées. À la fin de l'expérience, la distribution de la substance d'essai est déterminée et ses métabolites sont quantifiés, le cas échéant.

Dans les conditions appropriées, décrites dans cette méthode et dans le document d'orientation (2), on mesure l'absorption d'une substance d'essai au cours d'une période de temps donnée en analysant le fluide receveur et la peau traitée. La substance d'essai restant sur la peau doit être considérée comme étant absorbée, à moins qu'il soit démontré que l'on puisse déterminer l'absorption sur la seule base des valeurs relatives au fluide receveur. L'analyse des autres éléments (matières récupérées par nettoyage de la peau et matières restant à l'intérieur des couches dermiques) permet d'enrichir l'évaluation des données, en précisant notamment l'évacuation totale de la substance d'essai et le pourcentage de récupération.

Pour démontrer les performances et la fiabilité du système d'essai dans le laboratoire chargé de l'étude, les résultats relatifs aux substances chimiques de référence pertinentes doivent être tenus disponibles et être conformes à la littérature publiée pour la méthode utilisée. Pour répondre à cette exigence, on peut procéder à un essai simultané de la substance d'essai et d'une substance de référence appropriée (présentant de préférence une lipophilicité proche de celle de la substance d'essai), ou proposer un historique approprié relatif à un certain nombre de substances de référence présentant une lipophilicité différente (par exemple, la caféine, l'acide benzoïque et la testostérone).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. Cellule à diffusion

Une cellule à diffusion se compose d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur entre lesquels on place la peau (la figure 1 présente une cellule à diffusion de conception classique). La cellule doit répondre à plusieurs objectifs: assurer une bonne étanchéité sur le pourtour de la peau, permettre un échantillonnage aisé et un bon mélange de la solution dans le compartiment receveur en contact avec le dessous de la peau, et garantir le maintien de la température voulue au niveau de la cellule et de son contenu. Des cellules à diffusion statique ou dynamique peuvent indifféremment être utilisées. Normalement, les compartiments donneurs sont laissés sans occlusion pendant l'exposition à une dose finie d'une préparation d'essai. Toutefois, pour les applications infinies et pour certains scénarios avec des doses finies, l'occlusion du compartiment donneur peut être envisagée.

▼B**1.4.2. Fluide receveur**

L'emploi d'un fluide receveur compatible avec des éléments physiologiques doit être privilégié, mais d'autres fluides peuvent être utilisés à condition que ce choix soit justifié. La composition précise du fluide receveur doit être fournie. La bonne solubilité de la substance d'essai dans le fluide receveur doit être démontrée, de façon à garantir qu'il ne fait pas obstacle à l'absorption. En outre, le fluide receveur ne doit pas affecter l'intégrité de la préparation cutanée. Dans un système dynamique, la vitesse de l'écoulement ne doit pas gêner la diffusion de la substance d'essai dans le fluide receveur. Dans un système statique, le fluide doit être remué en permanence et échantillonné régulièrement. Si le métabolisme entre également dans le cadre de l'étude, le fluide receveur doit garantir la viabilité de la peau pendant toute la durée de l'expérience.

1.4.3. Préparations de peau

On peut utiliser indifféremment de la peau d'origine humaine ou animale. Il est entendu que l'utilisation de la peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique admises d'ordre national et international. L'utilisation d'une peau viable est préférable, mais une peau non viable peut aussi être utilisée dès lors que son intégrité est démontrée. Des membranes d'épiderme (séparées par procédé enzymatique, chimique ou à la chaleur) ou certaines strates de peau (d'une épaisseur généralement comprise entre 200 et 400 µm) préparées avec un dermatome peuvent être utilisées. Des épaisseurs de peau complètes peuvent être utilisées, mais il convient d'éviter les épaisseurs excessives (environ > 1 mm), sauf si elles sont spécifiquement requises pour examiner la substance d'essai dans les couches de la peau. Les différents choix effectués (espèce retenue, site anatomique et technique de préparation) doivent être justifiés. Des données acceptables pour un minimum de quatre essais répétés par préparation d'essai doivent être fournies.

1.4.4. Intégrité de la préparation cutanée

Il est essentiel que la peau soit correctement préparée. Toute manipulation inappropriée peut endommager le stratum corneum; il convient donc de contrôler l'intégrité de la peau préparée. Si le champ de l'étude englobe le métabolisme de la peau, une peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les plus courts délais, et dans des conditions propres à soutenir l'activité métabolique. De manière générale, la peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les 24 heures, mais la période de stockage acceptable peut varier selon le système enzymatique impliqué dans la métabolisation et les températures de stockage (13). Lorsque les préparations de peau ont été stockées avant utilisation, des éléments établissant qu'elles ont conservé toutes leurs fonctions doivent être présentés.

1.4.5. Substance d'essai

La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radio-marquée.

1.4.6. Préparation d'essai

La préparation de 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) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation «d'usage» doit être justifiée.

▼B**1.4.7. Concentrations et formulations des substances d'essai**

Normalement, plusieurs concentrations de la substance d'essai sont utilisées, de façon à couvrir le haut de la gamme des expositions humaines potentielles. De la même manière, on peut envisager d'étendre l'étude à un éventail de formulations classiques.

1.4.8. Application sur la peau

Dans les conditions normales de l'exposition humaine aux produits chimiques, des doses limites sont généralement rencontrées. Par conséquent, il convient d'utiliser des doses correspondant à l'exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm² pour une substance solide et jusqu'à 10 µl/cm² pour les liquides. La quantité retenue doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Par exemple, des applications infinies sur la surface de la peau peuvent être envisagées s'il s'agit d'étudier une exposition à des volumes importants par unité de surface.

1.4.9. Température

La température a une incidence sur la diffusion passive des produits chimiques (et ainsi sur leur absorption cutanée). Par conséquent, la cellule à diffusion et la peau doivent être maintenues à une température constante proche de la température normale de la peau, soit 32 +/- 1 °C. Selon la conception de la cellule, la température du bain ou du bloc de chauffage pourra varier, l'objectif étant de maintenir la peau et le compartiment receveur à leur norme physiologique. De préférence, l'humidité doit être maintenue entre 30 et 70 %.

1.4.10. Durée de l'exposition et échantillonnage

L'exposition de la peau à la préparation d'essai peut durer tout le temps de l'expérience, ou moins longtemps (par exemple pour imiter un type spécifique d'exposition humaine). La peau doit être lavée, à l'aide d'un agent lavant approprié, pour éliminer les excédents de la préparation d'essai, et les produits de rinçage utilisés doivent être collectés pour analyse. La procédure de retrait de la préparation, qui dépend des conditions d'utilisation envisagées, doit être justifiée. Normalement, une période d'échantillonnage de 24 heures est nécessaire pour permettre une caractérisation adéquate du profil d'absorption. Sachant que l'intégrité de la peau peut commencer à se détériorer au-delà de 24 heures, la durée d'échantillonnage ne doit normalement pas excéder 24 heures. Cette durée n'est pas nécessaire pour les substances d'essai qui pénètrent rapidement la peau, mais pour celles qui pénètrent lentement, des temps plus importants peuvent se révéler nécessaires. La fréquence d'échantillonnage du fluide receveur doit permettre d'établir une représentation graphique du profil d'absorption de la substance d'essai.

1.4.11. Procédures terminales

Tous les éléments du système d'essai (compartiment donneur, produits de rinçage de la surface de la peau, préparation cutanée et compartiment/fluide receveur) doivent être analysés et le niveau de récupération déterminé. Dans certains cas, il peut être nécessaire de fractionner la peau en zone de peau exposée et zone de peau sous le rebord de la cellule, et en couches correspondant au stratum corneum, à l'épiderme et aux différentes strates du derme, pour procéder à des analyses séparées.

1.4.12. Analyse

Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir une moyenne de 100 +/- 10 % de la radioactivité, tous les écarts devant être justifiés). La quantité de substance d'essai dans le fluide receveur, la préparation cutanée, les produits de rinçage de la surface de la peau et des appareils doivent être analysés selon des procédures appropriées.

▼B**2. RÉSULTATS**

L'analyse du fluide receveur, la distribution de la substance d'essai dans le système d'essai et le profil d'absorption dans le temps doivent être présentés. Dans des conditions d'exposition à une dose finie, la quantité de substance éliminée lors du nettoyage de la peau, la quantité présente dans la peau (et dans les différentes couches dermiques si celles-ci ont fait l'objet d'une analyse) et la quantité présente dans le fluide receveur (taux et quantité ou pourcentage de la dose appliquée) doivent être calculées. Parfois, l'absorption cutanée peut être exprimée à partir des seules données relatives au fluide receveur. Toutefois, lorsque de la substance d'essai reste dans la peau à la fin de l'étude, il peut être nécessaire de l'inclure dans la quantité totale absorbée [voir paragraphe 66 de la référence (3)]. Dans des conditions d'exposition à une dose infinie, les données peuvent permettre de calculer une constante de perméabilité (K_p). Dans ce dernier cas, le pourcentage absorbé n'est pas pertinent.

3. RAPPORT**3.1. RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique; propriétés physico-chimiques (au minimum, poids moléculaire et $\log P_{oe}$), pureté (pureté radiochimique),
- informations d'identification (par exemple numéro de lot),
- solubilité dans le fluide receveur.

Préparation de la substance d'essai:

- formulation et justification de l'utilisation,
- homogénéité.

Conditions d'essai:

- sources et site de la peau, méthode de préparation, conditions de stockage avant utilisation, prétraitement éventuel (nettoyage, traitement antibiotique, etc.), mesures de l'intégrité de la peau, état métabolique, justification de l'utilisation,
- conception de la cellule à diffusion, composition du fluide receveur, vitesse d'écoulement du fluide receveur ou temps et procédures d'échantillonnage,
- détails de l'application de la préparation d'essai et quantification de la dose appliquée,
- durée de l'exposition,
- détails sur l'élimination de la préparation d'essai présente sur la peau (par exemple rinçage de la peau),
- détails sur l'analyse de la peau et les techniques de fractionnement employées pour mettre en évidence la distribution dans la peau,

▼B

- procédures de nettoyage de la cellule et du matériel,
- méthodes d'essai, techniques d'extraction, seuils de détection et validation de la méthode analytique.

Résultats:

- récupération totale de l'expérience (dose appliquée = produits de rinçage de la peau + peau + fluide receveur + produits de rinçage de la cellule),
- tableau indiquant la récupération de chaque cellule dans chaque compartiment,
- profil d'absorption,
- tableau indiquant les données relatives à l'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentages).

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

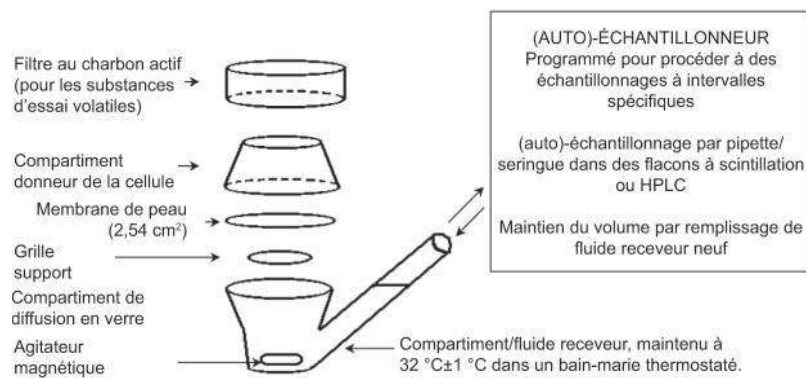
1. Méthode d'essai B.44. Absorption cutanée: méthode in vivo.
2. OCDE (2002). Document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée, OCDE, Paris.
3. OCDE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCDE, Paris.
4. Kempainen, BW and Reifenrath, WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
5. Bronaugh, RL and Collier, SW. (1991). Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237-241.
6. Bronaugh, RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
7. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques (1993). Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
8. Diembeck, W, Beck, H, Benech-Kieffer, F, Courtellemont, P, Dupuis, J, Lovell, W, Paye, M, Spengler, J, Steiling, W (1999). Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, p. 191-205.
9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.
10. Howes, D, Guy, R, Hadgraft, J, Heylings, JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

11. Schaefer, H and Redelmeier, TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
12. Roberts, MS and Walters, KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
13. Jewell, C, Heylings, JR., Clowes, HM. and Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Figure 1

Exemple de cellule à diffusion statique classiquement utilisée pour la conduite d'études d'absorption percutanée in vitro



▼ M3

B.46. IRRITATION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

INTRODUCTION

1. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une période allant jusqu'à quatre heures [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations unies (ONU) et le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (1)(3)]. La présente méthode d'essai propose une procédure *in vitro* pouvant servir à identifier les dangers liés aux produits chimiques (substances et mélanges) irritants correspondant à la définition du SGH de l'ONU et à la catégorie 2 du règlement CLP de l'Union européenne (1) (2) (3). Dans l'Union européenne et les autres régions n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative (substances faiblement irritantes) selon le SGH de l'ONU, la présente méthode d'essai peut aussi servir à identifier des produits chimiques non classés, c'est-à-dire ne relevant d'aucune catégorie dans le SGH de l'ONU ou le règlement CLP de l'Union européenne (1) (3). Cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer le pouvoir irritant pour la peau d'un produit chimique, en tant que méthode de substitution à part entière remplaçant l'essai d'irritation cutanée *in vivo*, dans le cadre d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux (4 et chapitre B.4 de la présente annexe).
2. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [LD 404 de l'OCDE, chapitre B.4 de la présente annexe] (4). Par souci du bien-être animal, le chapitre B.4 a été révisé en 2004 afin que la corrosion/irritation cutanée puisse être déterminée via une stratégie d'essai à plusieurs niveaux, faisant appel à des méthodes d'essai *in vitro* ou *ex vivo* validées, de manière à éviter d'infliger des souffrances aux animaux. Trois méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées: elles constituent respectivement les lignes directrices 430, 431 et 435 de l'OCDE (5) (6) (7) et deux d'entre elles les chapitres B.40 et B.40 *bis* de la présente annexe, qui sont destinées au volet «corrosivité» de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le chapitre B.4 de la présente annexe ou la LD 404 de l'OCDE (4).
3. La présente méthode d'essai porte sur le danger d'irritation cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un épiderme humain reconstitué qui, par sa conception globale (utilisation de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain en tant que source cellulaire, ainsi que de tissus et architectures cellulaires représentatifs), reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. La présente méthode d'essai comprend également un ensemble de normes de performance (appendice 2) pour l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées, développées par le ECVAM-EC (8), conformément aux principes du document d'orientation n° 34 de l'OCDE (9).
4. Il existe trois méthodes validées conformes à la présente méthode d'essai. Des études de prévalidation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour une méthode *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué, disponible dans le commerce sous le nom d'EpiSkin™ (et désignée comme la méthode de référence validée, ou MRV). Deux autres méthodes d'irritation cutanée *in vitro* sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné des résultats analogues à ceux de la MRV selon une validation fondée sur les normes de performance (21): il s'agit des méthodes EpiDerm™ SIT (EPI-200) et SkinEthic™ RHE (22).

▼ M3

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode *in vitro* sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée, autre que la MRV, EpiDerm™ SIT (EPI-200) ou SkinEthic™, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, de manière à s'assurer que ses caractéristiques sont comparables à celles de la MRV, conformément aux normes de performance figurant dans la présente méthode d'essai (appendice 2). En outre, il est recommandé de consulter le document explicatif accompagnant le projet de ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée *in vitro* avant de développer et de valider une méthode *in vitro* sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée et de la soumettre en vue d'une adoption réglementaire (23).

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. L'une des limites de la présente méthode d'essai, comme l'a démontré l'étude de validation (16), est qu'elle ne permet pas la classification des produits chimiques dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (1). Lorsqu'elle est utilisée en tant que méthode d'essai partiellement substitutive, un essai ultérieur *in vivo* peut être nécessaire pour compléter la caractérisation du potentiel d'irritation cutanée (4 et chapitre B.4 de la présente annexe). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.
8. La présente méthode d'essai se rapporte au volet «irritation cutanée *in vitro*» de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le chapitre B.4 (LD 404 de l'OCDE) pour les essais d'irritation/corrosion cutanée (4). Si elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée, on notera cependant que le chapitre B.40 *bis* (LD 431 de l'OCDE) relatif à la corrosion cutanée, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (chapitre B.40 *bis*). La présente méthode a recours à des modèles d'épiderme humain reconstitué utilisant des kératinocytes humains, et reproduisant donc *in vitro* l'organe cible de l'espèce étudiée. De plus, elle couvre directement l'étape initiale de la cascade inflammatoire/du mécanisme d'action (lésions cellulaires et tissulaires causant un traumatisme localisé) survenant au cours de l'irritation *in vivo*. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données empiriques de cette étude totalisait 58 produits chimiques (16) (18) (23). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des semi-solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation (24). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type. Il convient aussi de noter que les produits chimiques fortement colorés peuvent interférer avec les mesures de la viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger ces interférences (voir les paragraphes 24-26).
9. Une seule expérience réalisée à l'aide de trois répliquats de tissus identiques devrait suffire pour tester les substances dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents répliquats et/ou une viabilité moyenne égale à $50 \pm 5 \%$, une seconde expérience est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

▼ M3

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La substance d'essai est appliquée localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un *stratum corneum* multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe in vivo.
11. L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du *stratum corneum* et la lésion des couches sous-jacentes de kératinocytes. En mourant, les kératinocytes rejettent des médiateurs à l'origine de la cascade inflammatoire qui agit sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des érythèmes et des œdèmes observés (24). Les méthodes fondées sur l'utilisation d'épiderme humain reconstitué permettent de mesurer les événements déclencheurs de la cascade.
12. La viabilité cellulaire des modèles d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (25). Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé ($\leq 50\%$, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne). En fonction du cadre législatif dans lequel les résultats de la présente méthode d'essai sont utilisés, les produits chimiques produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants ($> 50\%$, sans catégorie).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'une des trois méthodes validées conformes à la présente méthode d'essai, les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en utilisant les 10 produits chimiques de référence énumérés au tableau 1. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode similaire développée conformément à cette méthode d'essai, ou une variante d'une des trois méthodes validées, il convient de répondre aux normes de performance décrites à l'appendice 2 de la présente méthode d'essai.
14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

Tableau 1

Produits chimiques de référence ⁽¹⁾

Produit chimique	Numéro CAS	Score in vivo ⁽²⁾	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne
acide naphtylacétique	86-87-3	0	solide	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	0,3	liquide	sans catégorie

▼ M3

Produit chimique	Numéro CAS	Score in vivo ⁽²⁾	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne
stéarate de méthyle	112-61-8	1	solide	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	1,7	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2,3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	liquide	catégorie 2
hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 5 %)	1310-58-3	3	liquide	catégorie 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	3,3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3,4	liquide	catégorie 2

⁽¹⁾ Ces produits chimiques de référence constituent un sous-ensemble des produits chimiques de référence utilisés dans l'étude de validation.

⁽²⁾ Score in vivo d'après B.4 et la ligne directrice 404 de l'OCDE (4).

⁽³⁾ Dans cette méthode d'essai, les substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (matières faiblement irritantes) (1) sont considérées comme «sans catégorie».

⁽⁴⁾ La catégorie 3 (facultative) du SGH de l'ONU n'est pas applicable dans le cadre du règlement CLP de l'Union européenne.

PROTOCOLE

15. Les éléments et le protocole d'une méthode d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après. Un modèle d'épiderme humain est reconstitué; le laboratoire peut le préparer lui-même ou l'obtenir dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour les méthodes EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) et SkinEthicTM RHE (26) (27) (28). Les essais se déroulent dans les conditions suivantes:

Éléments de la méthode d'essai sur épiderme humain reconstitué

Conditions générales

16. L'épithélium est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) doivent être présentes sous un *stratum corneum* fonctionnel. Le *stratum corneum* doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière est démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE₅₀) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée. Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le *stratum corneum* pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique.

▼ **M3***Conditions fonctionnelles*

Viabilité

17. La viabilité est mesurée au moyen du colorant MTT (25). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). La densité optique (DO) du solvant d'extraction seul est suffisamment faible, c'est-à-dire $< 0,1$. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai d'irritation cutanée) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les trois méthodes validées sont indiquées dans le tableau 2. Il est démontré que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2

Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 1,0$	$\leq 2,5$
SkinEthic™ RHE	$\geq 1,2$	$\leq 2,5$

Fonction de barrière

18. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances marqueurs cytotoxiques telles que le SDS ou le Triton X-100. Cette capacité est évaluée par la CI_{50} et le TE_{50} (tableau 3).

Morphologie

19. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche).

Reproductibilité

20. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs est démontrée.

Contrôle de qualité

21. Il incombe au développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué de garantir et de démontrer que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 17), à la fonction de barrière (paragraphe 18) et à la morphologie (paragraphe 19). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain (ou l'investigateur en cas d'utilisation d'un modèle «maison»). Seuls les résultats obtenus à l'aide de tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants des substances testées. À titre d'exemple, les plages d'acceptabilité pour les trois méthodes validées sont indiquées dans le tableau 3.

▼ M3

Tableau 3

Exemples de critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM) (18 heures de traitement par SDS) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 hr	ET ₅₀ = 9,0 h

Application des substances et mélanges chimiques d'essai et des substances et mélanges chimiques témoins

22. Il convient d'utiliser au minimum trois réplicats par essai pour chaque substance d'essai et pour les témoins. Pour les substances liquides comme pour les substances solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de substance et mélange chimiques d'essai pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum 25 µL/cm² ou 25 mg/cm². Dans le cas de substances ou mélanges solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact entre la substance et mélange chimique d'essai et la surface de l'épiderme. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. À la fin de la période d'exposition, la surface de l'épiderme est nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0,9 %, afin d'éliminer la substance d'essai. En fonction de la méthode validée utilisée, la période d'exposition peut varier entre 15 et 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37 °C. Les durées et températures d'exposition sont optimisées pour chacune des méthodes sur épiderme humain reconstitué, et tiennent compte des propriétés intrinsèques de chaque méthode. Pour de plus amples informations, voir les modes opératoires normalisés des trois méthodes (26) (27) (28).
23. Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) sont utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (dans le cas du TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. Pour les TN, il est recommandé d'utiliser de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline (PBS)].

Mesures de la viabilité cellulaire

24. L'aspect le plus important du protocole est que les mesures de la viabilité ne sont pas réalisées immédiatement après l'exposition aux substances d'essai, mais après une période d'incubation posttraitement suffisamment longue des tissus rincés dans un milieu frais. Cette période permet aussi bien la disparition des effets faiblement cytotoxiques que l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Durant la phase d'optimisation de l'essai (11) (12) (13) (14) (15), une période d'incubation posttraitement de 42 heures s'est révélée optimale.
25. Le test du MTT est une méthode quantitative validée, recommandée pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple 0,3-1 mg/mL) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (ex.: isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ± 30 nm au maximum.

▼ **M3**

26. Les propriétés optiques de la substance d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité (la substance d'essai pouvant aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer). Cela peut se produire lorsque la substance d'essai n'a pas été totalement éliminée du tissu par rinçage ou lorsqu'elle a pénétré dans l'épiderme. Si une substance d'essai agit directement sur le MTT (agent réducteur du MTT), est naturellement colorée, ou si elle se colore durant le traitement du tissu, des contrôles supplémentaires sont pratiqués pour détecter et corriger les interférences de la substance d'essai avec la mesure de la viabilité. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des trois méthodes validées (26) (27) (28).

Critères d'acceptabilité

27. Pour chaque méthode faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 21), les tissus traités par le témoin négatif (TN) présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception ainsi qu'à l'intégralité du protocole. Les valeurs de DO des témoins ne sont pas inférieures aux limites historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, rendent compte de leur capacité à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (26) (27) (28). Il y a lieu de définir les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les réplicats de tissu (par exemple, si des écarts types sont utilisés, ils se situent dans l'intervalle unilatéral de tolérance à 95 % calculé à partir des données historiques; pour la MRV, l'écart type est ≤ 18 %).

Interprétation des résultats et modèle prédictif

28. La valeur de DO obtenue pour chaque substance d'essai peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les substances d'essai irritantes et les substances d'essai non classées, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les substances irritantes, sont clairement définies et étayées par des données. Il conviendra par ailleurs de démontrer leur pertinence. Les valeurs seuils permettant de prédire les effets irritants sont indiquées ci-dessous:

- La substance d'essai est considérée comme irritante pour la peau conformément à la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne, si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieure ou égale (\leq) à 50 %.
- Selon le cadre législatif dans lequel les résultats de la présente méthode d'essai sont utilisés, la substance chimique d'essai peut être considérée comme non irritante pour la peau conformément à l'absence de catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne, si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est supérieure ($>$) à 50 %.

RÉSULTATS ET RAPPORT*Résultats*

29. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplikat de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque substance d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en reproduisant les expériences. Il conviendra en outre de préciser les valeurs moyennes \pm écart type correspondant à chaque essai. Les interactions observées avec le réactif MTT et les substances d'essai colorées seront signalées pour chaque substance testée.

▼ M3*Rapport d'essai*

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

Produits chimiques d'essai et témoin:

- nom(s) chimique(s), tels que le nom CAS, le numéro CAS, le nom et le numéro CE, s'ils sont connus,
- pureté et composition du produit chimique (en pourcentage en poids),
- propriétés physico-chimiques importantes pour l'exécution de l'essai (par exemple, état physique, stabilité, volatilité, pH et hydrosolubilité, s'ils sont connus),
- le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre),
- conditions de stockage.

Justification du choix du modèle d'épiderme humain reconstitué et du protocole utilisé

Conditions de l'essai:

- système cellulaire utilisé,
- informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):
 - i) viabilité,
 - ii) fonction de barrière,
 - iii) morphologie,
 - iv) reproductibilité et valeur prédictive,
 - v) contrôles de qualité (CQ) du modèle,
- détails du protocole utilisé,
- doses d'essai utilisées, durée de l'exposition et de la période d'incubation posttraitement,
- description de toute modification éventuelle du protocole,
- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative):
 - i) acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots,
 - ii) acceptabilité des valeurs des témoins positifs et négatifs par rapport aux moyennes et aux fourchettes des témoins positifs et négatifs,
- description des critères d'évaluation utilisés, notamment justification du choix des valeurs-seuils pour le modèle prédictif,
- référence aux données témoins historiques.

▼ **M3**

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque produit chimique d'essai pour chaque essai et chaque mesure de réplicat,
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou pour les produits chimiques d'essai colorants,
- description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

1. Nations unies (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, ONU New York et Genève, 2007, disponible à l'adresse suivante: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html].
2. EC-ECVAM (2009), Statement on the «Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards», publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC30), 9 avril 2009, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
3. Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.
4. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice n° 404, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
5. OCDE (2004), Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (TER), Ligne directrice n° 430, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
6. OCDE (2004), Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine, Ligne directrice n° 431, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
7. OCDE (2006), Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée, Lignes directrices n° 435, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
8. EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE), disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
9. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible en anglais à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
10. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. et Botham, P. (2001), A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.
11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. et Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765-770.

▼ M3

12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. et Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests, ALTEX 21, 107-114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. et Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.
14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. et Rubinsteen, G. (2005), The in vitro acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. et Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
17. Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α , disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
18. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. et Leclaire, J. (2007), In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.
20. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of in-vitro tests for skin irritation, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC26), 27 avril 2007, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing, Voir la rubrique «Validation Study Documents, section Skin Irritation», à l'adresse: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
22. EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC29), 5 novembre 2008, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
23. OCDE (2010), Document explicatif accompagnant le projet de Ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée in vitro. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 137, OCDE, Paris. [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
24. Welss, T., Basketter, D. A. et Schröder, K. R. (2004), In vitro skin irritation: fact and future, State of the art review of mechanisms and models. Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼ **M3**

25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
26. EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals, disponible à l'adresse: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
27. EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: In vitro EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT). For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200), disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
28. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 *bis* test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
29. Harvell, J. D., Lamminstausta, K., et Maibach, H. I. (1995), Irritant contact dermatitis. In: *Practical Contact Dermatitis*, p. 7-18, (Ed. Guin J. D.), Mc Graw-Hill, New York.
30. Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, JO L 225 du 21.8.2001, p. 1.
31. Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. et Robinson, M. K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test, *Contact Dermatitis* 51, 1-4.
32. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. et Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data, *ALTEX*, 14, 359-365.
33. Jirová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. et Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

▼ **M3***Appendice 1***Définitions**

CI₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE₅₀.

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est utilisé indifféremment à la place de «précision», et se définit comme la proportion de toutes les substances chimiques testées qui ont été correctement classées comme positives ou négatives (9).

Dose infinie: quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et substances chimiques d'essai possibles (9).

Fiabilité: mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (9).

Irritation cutanée: apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale, non immunogène, qui se manifeste peu après une stimulation (29). Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et iii) les niveaux de précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (9).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (9).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (9).

Produits chimiques de référence: produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence in vitro ou in vivo ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels la méthode d'essai est conçue, qu'elles soient fortes, faibles, ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (9).

▼ M3

Règlement CLP de l'Union européenne (règlement de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges): vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges) (3).

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Ce type d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (9).

Sensibilité: proportion des substances d'essai positives/actives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: proportion des substances d'essai négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Stratégie d'essai à plusieurs niveaux: essai faisant appel à plusieurs méthodes de manière séquentielle; les méthodes d'essai sélectionnées à chaque niveau sont déterminées par les résultats du niveau d'essai précédent (9).

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

TE₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI₅₀.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

▼ **M3***Appendice 2***Normes de performance pour l'évaluation de méthodes similaires ou modifiées proposées pour les essais d'irritation cutanée in vitro sur épiderme humain reconstitué**

INTRODUCTION

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement) ou non. Conçues à partir de méthodes validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la fiabilité et la précision d'autres méthodes analogues (aussi appelées «essais répliques»), fondées sur des principes scientifiques et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (9).

2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire les améliorations proposées d'une méthode approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation sera le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (9).

3. La fiabilité et la précision des méthodes d'essai similaires (répliques) ou des variantes de l'une des trois méthodes validées [EpiSkinTM (méthode de référence validée, MRV), EpiDermTM SIT (EPI-200) et SkinEthicTM RHE] proposées dans la présente méthode d'essai sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des scores d'irritation de Draize. Les valeurs de fiabilité et de précision obtenues, lors de l'évaluation des méthodes similaires ou modifiées proposées, à l'aide des 20 produits chimiques de référence recommandés dans les normes de performance (tableau 1) sont comparables à celles obtenues par la MRV ou meilleures que celles-ci (tableau 2) (2) (16). Les valeurs de fiabilité et de précision à atteindre sont indiquées aux paragraphes 8 à 12 du présent appendice. Des substances non classées («sans catégorie» dans le SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne) et classées (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne) (1) représentant différentes classes chimiques sont incluses afin que la fiabilité et la précision (sensibilité, spécificité et précision globale) de la méthode d'essai proposée puissent être comparées à celles de la MRV. Avant d'appliquer une méthode pour tester de nouveaux produits chimiques, il convient de déterminer sa fiabilité et son aptitude à détecter correctement les substances chimiques irritantes de la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne ainsi que, selon le cadre réglementaire pour lequel les données sont produites, son aptitude à détecter correctement les substances chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH.

4. Ces normes de performance sont fondées sur celles du ECVAM (8), mises à jour conformément aux systèmes SGH de l'ONU et CLP de l'Union européenne sur la classification et l'étiquetage (1) (3). Les normes de performance d'origine ont été définies à l'issue de l'étude de validation (21) et établies sur la base du système de classification de l'Union européenne tel que figurant dans la directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (1). À la suite de l'adoption par l'Union européenne du système

(1) JO L 225 du 21.8.2001, p. 1.

▼ **M3**

SGH de l'ONU pour la classification et l'étiquetage des substances chimiques (CLP de l'Union européenne) (3), intervenue entre la finalisation de l'étude de validation et l'achèvement de la présente méthode d'essai, les normes de performance ont été mises à jour (8). Les modifications portent principalement sur: i) l'ensemble de produits chimiques de référence utilisé dans les normes de performance; et ii) les valeurs définies pour la fiabilité et la précision (2) (23).

NORMES DE PERFORMANCE POUR LES MÉTHODES D'ESSAI D'IRRITATION CUTANÉE IN VITRO SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

5. Les normes de performance se composent des trois éléments suivants (9):

- I) les éléments essentiels de la méthode d'essai
- II) une liste minimale de produits chimiques de référence
- III) des valeurs définies de fiabilité et de précision

I) Éléments essentiels de la méthode d'essai

6. Il s'agit des éléments structurels, fonctionnels et procéduraux essentiels d'une méthode d'essai validée qui figurent dans le protocole de toute méthode structurellement et fonctionnellement similaire ou modifiée proposée. Ces éléments recouvrent les caractéristiques propres de la méthode, la description des points clés de la procédure et les mesures de contrôle de qualité. Le respect de ces éléments essentiels contribuera à garantir que les méthodes similaires ou modifiées proposées sont fondées sur les mêmes concepts que la MRV correspondante (9). Les éléments essentiels de la méthode d'essai sont décrits en détail aux paragraphes 16 à 21 de la présente méthode d'essai, et l'essai est réalisé de la manière suivante:

- conditions générales (paragraphe 16),
- conditions fonctionnelles, comprenant:
 - viabilité (paragraphe 17),
 - fonction de barrière (paragraphe 18),
 - morphologie (paragraphe 19),
 - reproductibilité (paragraphe 20),
 - contrôle de qualité (paragraphe 21).

II) Liste minimale de produits chimiques de référence

7. Les produits chimiques de référence sont utilisés pour déterminer si la fiabilité et la précision d'une méthode proposée similaire ou modifiée, dont on a démontré qu'elle était suffisamment similaire à la MRV sur les plans structurel et fonctionnel ou qu'elle représentait une modification mineure par rapport à l'une des trois méthodes validées, sont comparables à celles de la MRV ou meilleures que celles-ci (2) (8) (16) (23). Les 20 produits chimiques de référence recommandés figurant dans le tableau 1 comprennent des substances représentant différentes classes chimiques (catégories chimiques basées sur des groupes fonctionnels) et représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances fortement irritantes). Le tableau comprend dix substances classées dans la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et 10 substances non classées, parmi lesquelles trois relèvent de la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU. Aux fins de la présente méthode d'essai, la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU équivaut à «sans catégorie». Les produits chimiques figurant dans le tableau 1 sont sélectionnés parmi ceux qui sont utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de prévalidation et de validation de

▼ M3

la MRV, eu égard à leur fonction chimique et leur état physique (14) (18). Ces produits chimiques de référence représentent le nombre minimal de substances à utiliser pour évaluer la précision et la fiabilité d'une méthode proposée similaire ou modifiée, mais ne sont pas utilisés pour le développement de nouvelles méthodes. Si une substance du tableau n'est pas disponible, il est possible d'utiliser d'autres produits chimiques pour lesquels il existe des données de référence in vivo appropriées, choisis en premier lieu parmi ceux utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de prévalidation ou de validation de la MRV. Si nécessaire, il est possible d'ajouter à cette liste minimale d'autres produits chimiques représentant d'autres classes chimiques et pour lesquels on dispose de données de référence in vivo appropriées, afin d'évaluer plus avant la précision de la méthode proposée.

Tableau 1

Liste minimale de produits chimiques de référence pour la détermination des valeurs de précision et de fiabilité de méthodes d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées (1)

Produit chimique	Numéro CAS	État physique	Score in vivo	Cat. MRV in vitro	Cat. SGH/règlement CLP de l'Union européenne in vivo
1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	liquide	0	cat. 2	sans catégorie
phtalate de diéthyle	84-66-2	liquide	0	sans catégorie	sans catégorie
acide naphtylacétique	86-87-3	solide	0	sans catégorie	sans catégorie
phénoxyacétate d'allyle	7493-74-5	liquide	0,3	sans catégorie	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	liquide	0,3	sans catégorie	sans catégorie
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	liquide	1	cat. 2	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	solide	1	sans catégorie	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	liquide	1,7	sans catégorie	sans catégorie
salicylate d'hexyle	6259-76-3	liquide	2	sans catégorie	sans catégorie
cinnamaldéhyde	104-55-2	liquide	2	cat. 2	sans catégorie (cat. 3 facultative) (3)
décane-1-ol (2)	112-30-1	liquide	2,3	cat. 2	cat. 2
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	liquide	2,3	cat. 2	cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	liquide	2,7	cat. 2	cat. 2
hydrochlorure de 2-chloro-méthyl-4-méthoxy-3,5 diméthyl pyridine	86604-75-3	solide	2,7	cat. 2	cat. 2
Disulfure de dipropyle (2)	629-19-6	liquide	3	sans catégorie	cat. 2
hydroxyde de potassium (sol. aqueuse à 5 %)	1310-58-3	liquide	3	cat. 2	cat. 2
Méthyl-2 tert-butyle-5 thio-phénol; thio PTBT	7340-90-1	liquide	3,3	cat. 2	cat. 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	solide	3,3	cat. 2	cat. 2

▼ M3

Produit chimique	Numéro CAS	État physique	Score in vivo	Cat. MRV in vitro	Cat. SGH/règlement CLP de l'Union européenne in vivo
heptanal	111-71-7	liquide	3,4	cat. 2	cat. 2
tétrachloréthylène	127-18-4	liquide	4	cat. 2	cat. 2

(¹) La sélection des produits chimiques se fonde sur les critères suivants: i) les substances sont disponibles dans le commerce; ii) elles sont représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances très irritantes); iii) elles ont une structure chimique bien définie; iv) elles sont représentatives de la fonctionnalité chimique utilisée pour la validation; v) elles ne sont pas associées à un profil extrêmement toxique (cancérogène ou toxique pour la reproduction, par exemple) ni à des coûts d'élimination prohibitifs.

(²) Substances irritantes chez le lapin, mais pour lesquelles il existe des preuves fiables de leur caractère non irritant chez l'homme (31) (32) (33).

(³) Dans le cadre du SGH de l'ONU, pas dans le cadre du règlement CLP de l'Union européenne.

III) Valeurs définies de fiabilité et de précision

8. Afin d'établir la fiabilité et la précision de méthodes similaires ou modifiées proposées destinées à des transferts entre laboratoires, les 20 produits chimiques de référence du tableau 1 sont testés dans au moins trois laboratoires différents. Cependant, si la méthode est destinée à être utilisée dans un seul laboratoire, un essai interlaboratoires n'est pas indispensable à la validation. Il est toutefois essentiel que ces études de validation soient évaluées de manière indépendante par des organismes de validation reconnus au niveau international, conformément aux lignes directrices internationales en la matière (9). Dans chaque laboratoire, les 20 produits chimiques de référence font tous l'objet de trois essais indépendants les uns des autres, réalisés sur des lots de tissus différents et à des intervalles de temps suffisamment espacés. Chaque essai comporte au moins trois réplicats de tissus testés simultanément pour chaque produit chimique d'essai, TN et TP.
9. Le calcul des valeurs de la fiabilité et de la précision de la méthode proposée est effectué en tenant compte des quatre critères ci-dessous, afin de garantir qu'il est réalisé de manière prédéfinie et cohérente:
 1. Seules les données issues de séquences d'essais complètes peuvent être utilisées pour le calcul de la variabilité intralaboratoire ou interlaboratoires de la méthode et de la valeur prédictive (précision).
 2. La classification finale de chaque produit chimique de référence dans chaque laboratoire participant est obtenue en utilisant la valeur moyenne de la viabilité constatée lors des différents essais réalisés dans le cadre d'une séquence d'essais complète.
 3. Seules les données obtenues pour des produits chimiques dont les séquences d'essai ont été complétées dans tous les laboratoires participants sont retenues pour le calcul de la variabilité interlaboratoires de la méthode.
 4. Le calcul des valeurs de précision est réalisé en utilisant les prévisions individuelles des laboratoires obtenues pour les 20 produits chimiques de référence par les différents laboratoires participants.

Dans ce contexte, une **séquence d'essais** consiste en trois essais réalisés de manière indépendante dans un laboratoire pour un produit chimique d'essai donné. Une **séquence d'essais complète** est une séquence d'essais réalisée dans un laboratoire pour un produit chimique d'essai, et pour laquelle les trois essais sont recevables. Cela signifie que tout essai non recevable annule la séquence entière des trois essais.

Reproductibilité intralaboratoire

10. L'évaluation de la répétabilité intralaboratoire doit faire apparaître une concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et «sans catégorie») obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par un même laboratoire qui soit supérieure ou égale (\geq) à 90 %.

▼ **M3***Reproductibilité interlaboratoire*

11. Il n'est pas indispensable d'évaluer la reproductibilité interlaboratoire si la méthode proposée n'est utilisée que dans un seul laboratoire. En ce qui concerne les méthodes destinées à être transférées d'un laboratoire à l'autre, la concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et «sans catégorie») obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par au moins trois laboratoires (de préférence), est supérieure ou égale (\geq) à 80 %.

Valeur prédictive (précision)

12. La précision (sensibilité, spécificité et précision globale) de la méthode similaire ou modifiée proposée est comparable ou supérieure à celle de la MRV, en tenant compte des informations supplémentaires relatives à sa pertinence pour les espèces étudiées (tableau 2). La sensibilité est supérieure ou égale (\geq) à 80 % (2) (8) (23). Toutefois, une restriction spécifique supplémentaire s'applique à la sensibilité de la méthode *in vitro* proposée, à savoir que seules deux substances *in vivo* de catégorie 2, le décane-1-ol et le disulfure de dipropyle, peuvent être classées de manière erronée comme «sans catégorie» par plus d'un laboratoire participant. La spécificité de la méthode *in vitro* proposée est supérieure ou égale (\geq) à 70 % (2) (8) (23). Il n'existe aucune restriction supplémentaire concernant la spécificité de la méthode d'essai *in vitro* proposée, c'est-à-dire que tout laboratoire participant peut classer de manière erronée comme «sans catégorie» une substance *in vivo*, pourvu que la spécificité finale de la méthode d'essai reste dans la fourchette acceptable. La précision globale est supérieure ou égale (\geq) à 75 % (2) (8) (23). Bien que la sensibilité de la MRV calculée pour les 20 produits chimiques de référence figurant dans le tableau 1 soit égale à 90 %, la valeur de sensibilité minimum nécessaire pour qu'une méthode similaire ou modifiée soit considérée comme valable est fixée à 80 %, étant donné que le décane-1-ol (substance à la limite entre deux catégories) et le disulfure de dipropyle (un faux négatif de la MRV) sont connus pour être des produits non irritants chez l'homme (31) (32) (33), même s'ils ont été identifiés comme irritants lors de l'essai chez le lapin. Les modèles d'épiderme humain reconstitué étant construits à l'aide de cellules d'origine humaine, ils prédiront sans doute l'absence d'effets irritants de ces substances («sans catégorie») dans le SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne).

Tableau 2

Valeurs prédictives requises pour la sensibilité, la spécificité et la précision globale pour qu'une méthode similaire ou modifiée soit considérée comme valable

Sensibilité	Spécificité	Précision globale
$\geq 80 \%$	$\geq 70 \%$	$\geq 75 \%$

Critères d'acceptation de l'étude

13. Il est possible qu'un ou plusieurs essai(s) relatif(s) à une ou plusieurs substance(s) d'essai ne remplisse(nt) pas les critères d'acceptation pour les substances d'essai et témoins, ou qu'il(s) ne soi(en)t pas acceptable(s) pour d'autres raisons. Afin de compléter les données manquantes, deux essais supplémentaires au maximum pour chaque substance d'essai sont autorisés (nouvel essai). Plus précisément, étant donné qu'en cas de nouvel essai, les TP et TN sont également testés simultanément, deux essais supplémentaires au maximum peuvent être réalisés pour chaque substance d'essai.
14. Il est possible que, même après un nouvel essai, le nombre minimum de trois essais valables nécessaire pour chaque substance testée ne soit pas atteint pour tous les produits chimiques de référence dans tous les laboratoires participants, et que par conséquent la matrice de données obtenue soit incomplète. Dans ce cas, il convient de respecter les trois critères suivants afin de pouvoir considérer les jeux de données comme acceptables:

- 1) les 20 produits chimiques de référence font l'objet d'au moins une séquence d'essais complète;

▼ **M3**

- 2) dans au moins trois laboratoires participants, au minimum 85 % des séquences d'essais sont complètes (pour 20 produits chimiques, cela signifie trois séquences d'essais non recevables autorisées dans un seul laboratoire);
- 3) au minimum 90 % de toutes les séquences d'essais possibles issues d'au moins trois laboratoires sont complètes (pour 20 produits chimiques testés dans trois laboratoires, cela signifie six séquences d'essais non recevables autorisées au total).

«B.47 Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 437 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (OPCB) a été évaluée par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis, en collaboration avec le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM), en 2006 et 2010 (1)(2). La première évaluation visait à déterminer l'utilité de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (1). La seconde évaluation a consisté à déterminer l'utilité de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) non classés comme irritants pour l'œil ou provoquant de graves lésions oculaires (2). La base de données de validation OPCB contient au total 113 substances et 100 mélanges (2) (3). À l'issue de ces évaluations et de leur examen par les pairs, il a été conclu que cette méthode d'essai peut identifier correctement les produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1) ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (4) et du règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ⁽¹⁾, et son utilité scientifique a donc été validée dans les deux cas. Une lésion oculaire grave est une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique testé sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Les produits chimiques testés provoquant des lésions oculaires graves sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU. Les produits chimiques non classés comme irritants pour les yeux ou provoquant de graves lésions oculaires sont définis comme ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU, autrement dit, ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU. La présente méthode d'essai indique les applications recommandées et les limites de la méthode OPCB au regard de ces évaluations. Les principales différences entre la version originale de 2009 et la mise à jour de 2013 de la ligne directrice de l'OCDE concernent notamment: l'application de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification au titre du SGH de l'ONU (paragraphe 2 et 7 de la version originale); des éclaircissements sur l'applicabilité de la méthode OPCB pour tester les alcools, les cétones et les solides (paragraphe 6 et 7) ainsi que les substances et les mélanges (paragraphe 8); des éclaircissements sur la façon de tester les substances tensioactives et les mélanges contenant des tensioactifs (paragraphe 28); des mises à jour et des éclaircissements relatifs aux témoins positifs (paragraphe 39 et 40); une mise à jour des critères de décision concernant la méthode OPCB (paragraphe 47); une mise à jour des critères d'acceptation de l'étude (paragraphe 48); une mise à jour concernant les éléments du rapport d'essai (paragraphe 49); une mise à jour de l'appendice 1 sur les définitions; l'ajout de l'appendice 2 pour la valeur prédictive de la méthode d'essai OPCB dans différents systèmes de classification; une mise à jour de l'appendice 3 sur la liste des substances d'épreuve; et une mise à jour de l'appendice 4 sur le porte-cornée pour la méthode OPCB (paragraphe 1) et sur l'opacitomètre (paragraphe 2 et 3).

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p.1.

Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire in vitro ne pourra remplacer le test oculaire in vivo de Draize pour établir le degré d'irritation oculaire provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test oculaire de Draize (5). L'approche «top-down» (5) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant, alors que l'approche «bottom-up» (5) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification. La méthode OPCB est une méthode d'essai in vitro pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières, pour classer et étiqueter les produits chimiques en fonction de leur caractère dangereux pour l'œil. Alors qu'elle n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai in vivo sur les yeux de lapin, la méthode OPCB est recommandée comme première étape d'une stratégie d'essai telle que l'approche «top-down» suggérée par Scott et al. (5) pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, sans expérience supplémentaire (4). La méthode OPCB est aussi recommandée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, ainsi que le définit le SGH de l'ONU («sans catégorie») (4) dans le cadre d'une stratégie d'essai telle que l'approche «bottom-up» (5). Cependant, un produit chimique qui, avec la méthode OPCB, semble ne causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification pour irritation oculaire/lésion oculaire grave nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires (in vitro et/ou in vivo) pour établir une classification définitive.

L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel d'un produit chimique testé pour l'œil, mesuré par la propension du produit chimique à provoquer une opacité et une perméabilité accrue sur une cornée bovine isolée. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par: (i) la diminution de la capacité de transmission de la lumière (opacité); et (ii) l'augmentation du passage de la fluorescéine sodique (perméabilité). Les mesures de l'opacité et de la perméabilité de la cornée suite à son exposition au produit chimique testé sont ensuite combinées pour établir le score d'irritation in vitro (SIIV), utilisé pour classer le produit chimique testé en fonction de son pouvoir irritant.

Les définitions des termes utilisés sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

La présente méthode d'essai est fondée sur le protocole expérimental de la méthode OPCB de l'ICCVAM (6)(7), élaboré à l'origine à partir des informations provenant du protocole de l'Institute for in vitro Sciences (IIVS) et sur le protocole INVITTOX n° 124 (8). Ce dernier protocole a été utilisé lors de l'étude de pré-validation conduite en 1997-1998 sous l'égide de la Communauté européenne. Ces protocoles étaient tous deux fondés sur la méthode d'essai OPCB décrite pour la première fois par Gautheron et al. (9).

La méthode OPCB peut être utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, selon la définition du SGH de l'ONU, à savoir les produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce cadre, la méthode d'essai OPCB présente une précision globale de 79 % (150/191), un taux de faux positifs de 25 % (32/126) et un taux de faux négatifs de 14 % (9/65), en comparaison avec les données de

la méthode d'essai sur œil de lapin *in vivo*, classés selon le système de classification du SGH de l'ONU (3) (voir appendice 2, tableau 1). Si l'on exclut de la base de données les produits chimiques testés relevant de certaines classes chimiques (alcools, cétones) ou physiques (matières solides), la précision de la méthode OPCB au regard du système de classification du SGH de l'ONU est de 85 % (111/131), le taux de faux positifs de 20 % (16/81), et le taux de faux négatifs de 8 % (4/50). Les limites potentielles de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) concernent le taux élevé de faux positifs pour les alcools et les cétones, et le taux élevé de faux négatifs pour les substances solides, relevés dans la base de données de validation (1)(2)(3). Toutefois, tous les alcools et cétones n'étant pas surévalués par la méthode OPCB et certains étant correctement identifiés comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, on ne considère pas que ces deux groupes fonctionnels organiques sortent du champ d'application de la méthode d'essai. Il appartient à l'utilisateur appliquant cette méthode d'essai de décider si une surévaluation possible d'un alcool ou cétone est acceptable ou s'il est nécessaire de réaliser des tests complémentaires fondés sur une analyse du poids de la preuve. Concernant les taux de faux négatifs pour les solides, il convient de relever que les solides peuvent entraîner des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation oculaire *in vivo* de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (10). Il convient également de noter qu'aucun des faux négatifs identifiés dans la base de données de validation de l'ICCVAM (2)(3), lors de l'identification de produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), n'a produit un SIIV ≤ 3 , soit le critère utilisé pour identifier un produit chimique testé ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU. De plus, les faux négatifs obtenus avec la méthode OPCB dans ce contexte ne sont pas préoccupants car tous les produits chimiques testés qui produisent un SIIV > 3 et ≤ 55 feraient ensuite l'objet d'autres essais *in vitro* dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. Certains produits chimiques solides étant correctement identifiés avec la méthode OPCB comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, on ne considère pas non plus que cet état physique sorte du champ d'application de la méthode d'essai. Les chercheurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un SIIV > 55 indique un effet provoquant des lésions oculaires graves et de classer le produit chimique testé dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire. Comme mentionné précédemment, il convient toutefois d'interpréter avec prudence les résultats positifs obtenus avec des alcools ou des cétones en raison du risque de surestimation.

La méthode OPCB peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave suivant le système de classification du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce cadre, la méthode d'essai OPCB présente une précision d'ensemble de 69 % (135/196), un taux de faux positifs de 69 % (61/89) et un taux de faux négatifs de 0 % (0/107), en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (3) (voir appendice II, tableau 2). Le taux de faux positifs obtenu (produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU *in vivo* produisant un SIIV > 3 , voir paragraphe 47) est considérablement élevé, mais pas préoccupant dans ce contexte car tous les produits chimiques testés qui produisent un SIIV > 3 et ≤ 55 feraient ensuite l'objet d'autres essais *in vitro* dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. La méthode OPCB ne montre aucune limite spécifique pour tester les alcools, les cétones et les solides quand l'objectif est d'identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU) (3). Les chercheurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un résultat négatif (SIIV ≤ 3) indique qu'aucune classification n'est requise («sans catégorie» du SGH de l'ONU). La méthode OPCB ne parvenant à identifier correctement que 31 % des produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, cette méthode d'essai ne doit pas être privilégiée pour lancer une approche «bottom-up» (5), si d'autres méthodes *in vitro* validées et acceptées avec une sensibilité élevée similaire mais une spécificité supérieure sont possibles.

La base de données de validation OPCB contient au total 113 substances et 100 mélanges (2)(3). La méthode OPCB semble donc pouvoir s'appliquer aux essais des substances et des mélanges.

La méthode OPCB n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques testés qui devraient être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou catégorie 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques testés qui devraient être classés comme légèrement irritants pour l'œil (catégorie 2B du SGH de l'ONU) en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU sous-classés dans les catégories 2, 2A ou 2B, du SGH de l'ONU et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU surclassés dans les catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU (2)(3). Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.

Tous les modes opératoires sur l'œil de bovin doivent respecter les réglementations applicables aux installations d'essai et les protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. L'usage des précautions universelles de laboratoire est recommandé (11).

Bien que la méthode OPCB ne prenne pas en considération les lésions conjonctivales et iridiennes, elle prend en compte les lésions cornéennes, qui sont le facteur principal dans la classification selon les effets *in vivo*, dans le cadre d'application du SGH de l'ONU. La réversibilité des lésions cornéennes ne peut pas, par définition, être évaluée avec la méthode OPCB. Il a été proposé, sur la base d'études menées sur l'œil de lapin, qu'une évaluation de la profondeur initiale de la lésion cornéenne puisse être utilisée pour distinguer les effets réversibles des effets irréversibles (12). Cependant, des connaissances scientifiques approfondies seront nécessaires pour comprendre comment les effets irréversibles qui ne sont pas liés à une lésion initiale importante peuvent survenir. Enfin, la méthode OPCB ne permet pas d'évaluer la toxicité systémique potentielle associée à l'exposition oculaire.

La présente méthode d'essai sera mise à jour régulièrement, à mesure que de nouvelles informations et données seront examinées. Ainsi, l'histopathologie peut s'avérer utile lorsqu'une caractérisation plus complète de la lésion cornéenne est nécessaire. Comme indiqué dans le Document d'orientation no. 160 (13), les utilisateurs sont encouragés à conserver les cornées et à préparer des spécimens histopathologiques en vue d'établir une base de données et de définir des critères de décision susceptibles d'améliorer la précision de cette méthode d'essai.

Pour tout laboratoire mettant en œuvre la méthode d'essai pour la première fois, la liste des produits chimiques d'épreuve de compétence est fournie à l'appendice 3. Un laboratoire peut utiliser ces produits chimiques afin de démontrer sa compétence technique dans la conduite de l'essai OPCB avant de soumettre des données résultant de l'application de la méthode OPCB à des fins réglementaires de classification des dangers.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai OPCB est un modèle organotypique qui permet de maintenir *in vitro* les fonctions physiologiques et biochimiques normales de la cornée bovine pendant une courte période. Selon cette méthode, les dommages causés par le produit chimique testé sont évalués par des mesures quantitatives des modifications de l'opacité et de la perméabilité de la cornée réalisées, respectivement, à l'aide d'un opacitomètre et d'un spectrophotomètre visible. Ces deux mesures entrent dans le calcul de l'IVIS, valeur utilisée pour assigner une catégorie de classification de danger d'irritation *in vitro* permettant d'estimer le potentiel d'irritation oculaire *in vivo* d'un produit chimique testé (voir «Critères de décision» au paragraphe 48).

La méthode d'essai OPCB utilise des cornées isolées provenant d'yeux de bovins récemment abattus. L'opacité cornéenne est mesurée par la quantité de lumière traversant la cornée. La perméabilité est mesurée par la quantité de fluorescéine sodique traversant toute l'épaisseur de la cornée, et détectée dans le milieu de la chambre postérieure. Les produits chimiques testés sont appliqués sur la surface épithéliale de la cornée en étant ajoutés dans la chambre antérieure du porte-cornée. L'appendice 4 présente une description et un schéma de porte-cornée utilisé dans la méthode OPCB. Ces appareils sont disponibles dans le commerce auprès de différents fabricants, ou peuvent être construits.

Provenance et âge des yeux de bovins et sélection des espèces animales

Les bovins envoyés à l'abattoir sont généralement destinés à la consommation humaine ou à d'autres usages commerciaux. Seules les cornées de bêtes en bonne santé, considérées comme propres à intégrer la chaîne alimentaire humaine, sont prélevées pour la méthode OPCB. Le poids des bovins variant considérablement en fonction de la race, de l'âge et du sexe, il n'existe aucune recommandation spécifique en la matière au moment de l'abattage.

L'utilisation d'yeux provenant d'animaux d'âges différents peut entraîner des variations de dimension des cornées. Les cornées dont le diamètre horizontal est supérieur à 30,5 mm et l'épaisseur cornéenne centrale (ECC) supérieure ou égale à 1 100 µm ont généralement été prélevées sur des bovins de plus de huit ans, tandis que les cornées ayant un diamètre horizontal inférieur à 28,5 mm et une ECC inférieure à 900 µm proviennent plutôt de bêtes de moins de cinq ans (14). En conséquence, les yeux des bovins âgés de plus de 60 mois ne sont généralement pas utilisés. En général, les yeux des bovins de moins de 12 mois ne sont pas non plus utilisés, car leur développement n'est pas terminé et l'épaisseur ainsi que le diamètre cornéen sont nettement inférieurs à ceux des yeux provenant de bovins adultes. Toutefois, les cornées issues d'animaux jeunes (entre 6 et 12 mois) sont acceptables car elles présentent certains avantages, tels qu'une plus grande disponibilité, une fourchette d'âge plus restreinte, et des risques moins importants d'exposition potentielle à l'encéphalopathie spongiforme bovine (15) pour le personnel. Une évaluation plus poussée des effets de la taille ou de l'épaisseur cornéenne sur la sensibilité aux produits chimiques corrosifs et irritants serait d'une grande utilité, aussi les utilisateurs sont-ils encouragés à consigner l'âge et/ou le poids estimés des animaux ayant fourni les cornées utilisées dans l'étude.

Collecte et transport des yeux jusqu'au laboratoire

Les yeux sont prélevés par les employés des abattoirs. Afin de limiter le plus possible tout endommagement, mécanique ou autre, des yeux, ceux-ci doivent être énucléés dès que possible après la mort de l'animal et immédiatement refroidies après énucléation et pendant le transport. Pour éviter d'exposer les yeux à des produits chimiques potentiellement irritants, les employés de l'abattoir ne doivent pas utiliser de détergent lors du rinçage de la tête de l'animal.

Les yeux doivent être totalement immergés dans une solution froide saline équilibrée de Hank (HBSS), dans un récipient de taille adaptée, et transportés jusqu'au laboratoire en ayant soin de limiter le plus possible tout endommagement et/ou contamination bactérienne. Les yeux étant prélevés au cours de l'abattage, ils risquent d'entrer en contact avec du sang ou d'autres matières biologiques, notamment des bactéries ou autres microorganismes. Il importe donc de réduire au minimum le risque de contamination (par exemple en plaçant le récipient contenant les yeux sur de la glace mouillée, pendant la collecte et le transport, ou en ajoutant des antibiotiques à la HBSS utilisée pour le transport [100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, par exemple]).

Il faut limiter au maximum l'intervalle de temps entre le prélèvement des yeux et l'utilisation des cornées dans le cadre de l'essai OPCB (l'utilisation doit avoir lieu le jour même du prélèvement) et démontrer qu'il ne compromet pas les résultats de l'essai. Ces résultats se fondent sur les critères de sélection des yeux, ainsi que sur les réponses des témoins positifs et négatifs. Tous les yeux utilisés au cours de l'essai doivent provenir d'un lot d'yeux collectés le même jour.

Critères de sélection des yeux utilisés pour la méthode OPCB

Une fois parvenus au laboratoire, les yeux sont examinés avec soin pour déceler d'éventuels défauts, tels qu'une opacité avancée, des éraflures ou une néovascularisation. Seules les cornées d'yeux exempts de tout défaut seront utilisées.

La qualité de chaque cornée est également évaluée à des stades ultérieurs de l'essai. Les cornées présentant une opacité supérieure à sept unités d'opacité ou l'équivalent pour l'opacitomètre et le porte-cornée utilisés après une période initiale d'équilibration d'une heure doivent être écartées (NB: l'opacitomètre doit être étalonné en fonction des normes d'opacité utilisées pour définir les unités d'opacité, voir appendice 4).

Chaque groupe de traitement (produit chimique testé et témoins négatifs et positifs) est composé de trois yeux au minimum. L'essai OPCB nécessite trois cornées servant de témoins négatifs. Toutes les cornées étant prélevées sur le globe oculaire entier puis placées dans les chambres du porte-cornée, les manipulations peuvent entraîner d'éventuels artefacts sur les valeurs de l'opacité et de la perméabilité cornéennes de chaque élément (y compris le témoin négatif). Par ailleurs, les valeurs d'opacité et de perméabilité mesurées sur les cornées témoins négatives servent à corriger les valeurs d'opacité et de perméabilité cornéennes des spécimens et des témoins traités positifs lors du calcul du score d'irritation in vitro.

MODE OPERATOIRE

Préparation des yeux

Des cornées exemptes de tout défaut sont découpées en conservant un rebord de 2 à 3 mm de sclère destiné à faciliter les manipulations ultérieures, et en prenant soin de ne pas endommager l'épithélium et l'endothélium cornéens. Les cornées isolées sont placées dans des porte-cornées spécialement conçus à cet effet, qui se composent de deux compartiments, antérieur et postérieur, respectivement en contact avec les faces épithéliale et endothéliale de la cornée. Il convient de remplir jusqu'à débordement ces deux chambres d'un milieu essentiel minimum de Eagle (MEME) préalablement chauffé et ne contenant pas de phénol rouge (en commençant par la chambre postérieure), en évitant toute formation de bulles d'air. L'appareil est ensuite équilibré à une température de $32 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant une heure au moins, afin que les cornées s'équilibrent avec le milieu et atteignent une activité métabolique aussi proche de la normale que possible (la température de la surface cornéenne in vivo est d'environ 32°C).

Après la période d'équilibration, un nouveau MEME préalablement chauffé et ne contenant pas de phénol rouge est ajouté dans les deux chambres, et une première mesure d'opacité est effectuée pour chaque cornée. Les cornées présentant une altération macroscopique des tissus (éraflures, pigmentation ou néovascularisation, par exemple) ou une opacité supérieure à 7 unités d'opacité, ou l'équivalent pour l'opacimètre et le porte-cornée utilisé, sont écartées. Au moins trois cornées sont sélectionnées pour servir de témoins négatifs (ou témoins de solvant). Les cornées restantes sont ensuite réparties entre le groupe de traitement et celui des témoins positifs.

La capacité calorifique de l'eau étant supérieure à celle de l'air, l'eau procure des conditions de température plus stables pour l'incubation. Aussi est-il recommandé de plonger le porte-cornée dans un bain d'eau pour maintenir son contenu à $32 \pm 1^\circ \text{C}$. Toutefois, il est également possible d'utiliser des incubateurs à air, à condition d'assurer la stabilité de la température (en chauffant au préalable les porte-cornées et les milieux, par exemple).

Application du produit chimique testé

Deux protocoles d'application différents sont utilisés, l'un pour les liquides et les tensioactifs (solides ou liquides), et l'autre pour les solides non tensioactifs.

Les liquides sont testés non dilués. Les semi-solides, les crèmes et les cires sont typiquement testés comme les liquides. Les tensioactifs sont testés à une concentration de 10 % en masse volumique dans une solution de chlorure de sodium 0,9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Il conviendra de justifier de façon idoine l'utilisation de tout autre taux de concentration. Les mélanges contenant des tensioactifs peuvent être testés sans être dilués ou dilués à une concentration adéquate en fonction de la situation d'exposition in vivo. Il conviendra de justifier de façon idoine la concentration utilisée. Les cornées sont ensuite exposées aux liquides ou tensioactifs pendant 10 minutes. L'utilisation d'une autre durée d'exposition devra être scientifiquement justifiée. Il convient de se rapporter à l'appendice 1 pour la définition d'un tensioactif et d'un mélange contenant des tensioactifs.

Les solides non tensioactifs sont généralement testés sous forme de solutions ou de suspensions à une concentration poids/volume de 20 % dans une solution de chlorure de sodium 0,9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Dans certaines circonstances et uniquement si cela est justifié scientifiquement, les solides peuvent aussi être testés purs par application directe sur la surface cornéenne, selon la méthode en chambre ouverte (voir paragraphe 32). Les cornées sont exposées aux solides pendant quatre heures, mais comme pour les liquides et les tensioactifs, des durées d'exposition différentes sont possibles moyennant une justification scientifique appropriée.

Différentes méthodes d'application peuvent être utilisées, en fonction de la nature physique et des caractéristiques chimiques des produits chimiques testés (solides, liquides, liquides visqueux ou non visqueux, par exemple). Il est très important que le produit chimique testé recouvre convenablement la surface épithéliale puis soit correctement retirée durant les étapes de rinçage. Il conviendra généralement d'utiliser la méthode en chambre fermée pour les produits chimiques testés liquides non visqueux ou légèrement visqueux, tandis que la méthode en chambre ouverte sera privilégiée pour les produits chimiques testés semi-visqueux et visqueux et pour les solides purs.

Dans la méthode en chambre fermée, une quantité de produit chimique testé suffisante pour recouvrir la face épithéliale de la cornée (750 µl) est introduite dans la chambre antérieure par les trous de dosage situés sur la face supérieure de celle-ci. Les trous sont ensuite occultés à l'aide de capuchons durant la durée d'exposition. Il importe de s'assurer que chaque cornée est exposée à un produit chimique testé pendant la durée qui convient.

Dans la méthode en chambre ouverte, la goupille de fermeture et la fenêtre en verre de la chambre antérieure sont retirés avant l'application. Le produit chimique testé ou témoin (750 µl, ou une quantité suffisante pour recouvrir entièrement la cornée) est directement appliqué sur la surface épithéliale cornéenne à l'aide d'une micropipette. Si le produit chimique testé est difficile à pipeter, il est possible d'utiliser une pipette à déplacement positif qui permet un dosage plus précis. L'embout de la pipette à déplacement positif est inséré dans l'embout distributeur de la seringue de manière à ce que le produit chimique testé puisse être chargé dans la pipette sous pression. Il convient ensuite de pousser le piston de la seringue tout en tirant simultanément celui de la pipette. Si des bulles d'air se forment dans l'embout de la pipette, il faut alors retirer le produit chimique testé (en l'expulsant) et répéter le processus jusqu'à ce qu'aucune bulle d'air n'apparaisse au moment du remplissage de la pipette. Il est possible d'utiliser si nécessaire une seringue normale (sans aiguille), ce qui permet de mesurer un volume précis de produit chimique testé et de l'appliquer plus facilement sur la surface épithéliale de la cornée. Après le dosage, la fenêtre en verre est remplacée sur l'ouverture de la chambre antérieure afin de recréer un système fermé.

Incubation post-exposition

Après la période d'exposition, le produit chimique testé, ou le produit chimique témoin négatif ou positif, est retiré de la chambre antérieure et l'épithélium est rincé au moins trois fois (ou jusqu'à ce qu'aucune trace du produit chimique testé ne soit plus visible) au moyen d'un MEME contenant du rouge de phénol. Le rinçage est effectué à l'aide d'un milieu contenant du rouge de phénol, dont le changement de couleur permet de déterminer l'efficacité du rinçage des produits chimiques d'essai acides ou alcalins. Il convient de laver à nouveau les cornées si, après trois rinçages, le rouge de phénol est encore altéré (jaune ou violet) ou si le produit chimique testé est toujours visible. Une fois le milieu débarrassé du produit chimique testé, les cornées subissent un dernier rinçage avec un MEME sans rouge de phénol, ce qui permet de s'assurer que la chambre antérieure est débarrassée de tout rouge de phénol avant la mesure d'opacité. La chambre antérieure est ensuite à nouveau remplie d'un MEME neuf sans rouge de phénol.

Pour les liquides et les tensioactifs, les cornées sont incubées après rinçage pendant deux heures supplémentaires à $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Il peut être utile, dans certaines circonstances (déterminées au cas par cas), de prévoir une durée d'incubation post-exposition plus longue. Les cornées sur lesquelles des solides ont été appliqués sont soigneusement rincées après une période d'exposition de quatre heures, et ne requièrent pas d'incubation supplémentaire.

Au terme de la période d'incubation post-exposition pour les liquides et les tensioactifs, et au terme de la période d'exposition de quatre heures pour les solides non tensioactifs, le degré d'opacité et de perméabilité de chaque cornée est enregistré. En outre, chaque cornée est observée visuellement et des commentaires pertinents sont consignés (exfoliation des tissus, résidus de produit chimique testé ou opacité non uniforme, par exemple). Ces observations peuvent s'avérer importantes car elles peuvent être reflétées par des variations de lecture de l'opacimètre.

Produits chimiques témoins

Des témoins négatifs ou des témoins de solvant/véhicule ainsi que des témoins positifs doivent être inclus en parallèle dans chaque expérience.

Lorsqu'une substance liquide non diluée est soumise à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB une substance témoin négatif concurrente (solution de chlorure de sodium 0,9 % ou eau distillée, par exemple) afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'évaluation de l'essai. Cette méthode permet également de garantir que les conditions de l'essai n'entraînent aucune réaction d'irritation indésirable.

Lorsqu'un liquide dilué, un tensioactif ou un solide est soumis à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB un groupe témoin de solvant/véhicule concurrent afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'efficacité de l'essai. On utilisera uniquement des solvants/véhicules dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée.

Un produit chimique reconnu pour générer une réponse positive est inclus dans chaque expérience afin de vérifier l'intégrité du dispositif d'essai et de son bon fonctionnement. Cependant, afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, l'ampleur des effets irritants ne devra pas être excessive.

Pour les produits chimiques liquides, les témoins positifs peuvent être composés de 100 % d'éthanol ou de 100 % de diméthylformamide. Pour les produits chimiques solides, les témoins positifs peuvent être composés d'imidazole à 20 % (en masse volumique) dans une solution de chlorure de sodium 0,9 %, par exemple.

Des produits chimiques étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un irritant oculaire dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

Effets mesurés

L'opacité est déterminée par la quantité de lumière traversant la cornée. L'opacité de la cornée est mesurée de manière quantitative à l'aide d'un opacitomètre, qui donne des valeurs d'opacité situées sur une échelle continue.

La perméabilité est déterminée par la quantité de fluorescéine sodique pénétrant la totalité des couches cellulaires de la cornée (de l'épithélium sur la surface externe de la cornée à l'endothélium sur sa surface interne). Un volume de 1 ml de solution de fluorescéine sodique (respectivement 4 ou 5 mg/ml lors d'essais portant sur des liquides et des tensioactifs ou sur des solides non tensioactifs) est introduit dans la chambre antérieure du porte-cornée, en contact avec la face épithéliale de la cornée, tandis que la chambre postérieure, en contact avec la face endothéliale, est remplie d'un nouveau MEME. Le porte-cornée est ensuite incubé en position horizontale pendant 90 ± 5 min à une température de $32 \pm 1^\circ\text{C}$. La quantité de fluorescéine sodique passant dans la chambre postérieure est mesurée quantitativement par spectrophotométrie UV-visible. Les mesures spectrophotométriques évaluées à 490 nm sont enregistrées en tant que valeurs de densité optique (DO_{490}) ou d'absorbance, mesurées sur une échelle continue. La perméabilité de la fluorescéine est déterminée à l'aide des valeurs de DO_{490} données par un spectrophotomètre visible utilisant un trajet optique standard de 1 cm.

Il est également possible d'utiliser un lecteur de plaques de microtitration 96 puits, à condition: (i) de pouvoir définir l'intervalle linéaire du lecteur de plaque servant à déterminer les valeurs de la DO_{490} par la fluorescéine; et (ii) d'utiliser le bon volume d'échantillons de fluorescéine sur la plaque 96 puits afin d'obtenir des valeurs de la DO_{490} équivalentes au trajet optique standard de 1 cm (ce qui peut nécessiter de remplir entièrement les puits [généralement 360 μl]).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

Une fois que les valeurs d'opacité et de perméabilité moyenne (DO_{490}) ont été corrigées de l'opacité de fond et des valeurs DO_{490} de perméabilité des témoins négatifs, l'opacité moyenne et les valeurs DO_{490} de perméabilité pour chaque groupe de traitement doivent être combinées dans une formule dérivée empiriquement pour calculer comme suit le score in vitro (IVIS) de chaque groupe de traitement:

$$\text{IVIS} = \text{valeur moyenne d'opacité} + (15 \times \text{valeur } \text{DO}_{490} \text{ moyenne de perméabilité})$$

D'après Sina et al. (16), cette formule a été dérivée au cours d'études internes et inter-laboratoires. Les données générées pour une série de 36 composés dans le cadre d'une étude inter-laboratoires ont été soumises à une analyse à variables multiples afin de déterminer l'équation du meilleur ajustement entre les données in vivo et in vitro. Des scientifiques travaillant dans deux entreprises distinctes ont effectué cette analyse et ont dérivé des équations pratiquement identiques.

Les valeurs d'opacité et de perméabilité doivent également être évaluées de manière indépendante afin de déterminer si un produit chimique testé a provoqué une corrosion ou une forte irritation pour un seul des deux paramètres (voir «Critères de décision»).

Critères de décision

Les valeurs critiques déterminante pour l'identification des produits chimiques induisant des lésions oculaires graves pour l'œil (catégorie 1 de SGH de l'O.N.U.) par rapport aux produits chimiques ne nécessitant pas de classifications pour l'irritation oculaire ou pour les dommages lésions oculaires graves (ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'O.N.U.) sont fournies ci-dessous:

IVIS	SGH de l'O.N.U.
≤ 3	Sans catégorie
> 3; ≤ 55	Aucune prédiction ne peut être faite
> 55	Catégorie 1

Critères d'acceptation de l'étude

Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif présente un IVIS compris dans un intervalle de deux écarts-types autour de la moyenne historique actuelle, qui doit être mise à jour au moins tous les trois mois, ou à chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Les réponses du témoin négatif ou du témoin de solvant/véhicule doivent donner des valeurs d'opacité et de perméabilité situées en-deçà des limites maximales établies pour les valeurs d'opacité et de perméabilité de fond des cornées bovines traitées avec les témoins négatifs ou les témoins de solvant/véhicule correspondants. Une seule expérience composée d'au moins trois cornées doit être suffisante pour tester un produit chimique quand la classification résultante est sans équivoque. Cependant, dans le cas de résultats équivoques dans la première expérience, une seconde expérience devrait être considérée (mais pas nécessairement requise), ainsi qu'une troisième tentative dans le cas de résultats IVIS moyens discordants entre les deux premières expériences. Dans ce contexte, un résultat en première tentative est considéré comme équivoque si les prédictions résultant des trois cornées ne sont pas concordantes, comme suit:

- Deux des trois cornées ont donné des prédictions discordantes par rapport à la moyenne des trois cornées, ou
- Une des trois cornées a donné une prédiction discordante de la moyenne des trois cornées, et le résultat discordant était supérieur à 10 unités IVIS de la valeur critique de 55.
- Si la répétition de l'expérience corrobore la prédiction de l'expérience initiale (sur la base de la valeur moyenne IVIS), alors la décision finale peut être prise sans expérience supplémentaire. Si la répétition de l'expérience fournit une prédiction discordante par rapport à la première expérience, (sur la base de la valeur moyenne IVIS), alors une troisième et dernière expérience devrait être menée pour résoudre les prédictions équivoques, et ainsi permettre de classer le produit chimique. Il peut être accordé de ne pas faire d'expérience supplémentaire pour la classification et l'étiquetage dans le cas où l'expérience résulte en une prédiction de catégorie 1 du SGH de l'O.N.U.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes, dès lors qu'elles s'appliquent à l'étude:

Produit chimique testé et témoins

- nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus; le numéro d'enregistrement CAS (CASRN), s'il est connu;

- pureté et composition du produit chimique testé ou de la préparation et des produits chimiques témoins [en pourcentage(s) par unité de poids], dans la mesure où cette information est disponible;
- propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;
- le cas échéant, traitement des produits chimiques testés/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, broyage);
- stabilité (si elle est connue).

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

- nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- opacimètre utilisé (par ex., modèle et spécifications) et réglages de l'instrument;
- informations concernant l'étalonnage des appareils de mesure de l'opacité et de la perméabilité (p. ex. opacimètre et spectrophotomètre) pour assurer la linéarité des mesures;
- type de porte-cornée utilisé (p.ex. modèle et spécifications);
- description des autres appareils utilisés;
- procédure utilisée pour garantir l'intégrité (c'est-à-dire la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (par ex., essais périodiques de substances d'épreuve des compétences, utilisation de données historiques sur les témoins négatifs et positifs).

Critères d'acceptabilité de l'essai

- intervalles de valeurs acceptables pour les témoins positifs et négatifs concurrents, d'après les données historiques;
- le cas échéant, intervalles de valeurs acceptables pour les témoins étalons concurrents, d'après les données historiques.

Collecte des yeux et préparation

- identification de la source d'obtention des yeux (c'est-à-dire l'établissement fournisseur des yeux)
- diamètre des cornées afin d'établir l'âge des animaux et de justifier leur utilisation dans cet essai;
- Stockage et conditions de transport des yeux p.ex. date et heure de la collecte, intervalle de temps avant le début de l'essai, milieu de transport et conditions de température, utilisation d'antibiotiques le cas échéant;
- préparation et montage des cornées bovines, remarques concernant leur qualité; températures des porte-cornée, et critères d'utilisation pour la conduite de l'essai

Procédure de l'essai

- nombre de réplicats utilisés;
- identité des témoins positif(s) et négatif(s) utilisés (le cas échéant le solvant utilisé et les produits chimiques de référence);
- concentration(s) du produit chimique testé, application, durée d'exposition et de post-exposition;
- description des critères d'évaluation et de décision utilisés;
- description des critères d'acceptation de l'étude;
- description de toute modification apportée à la procédure;
- Description des critères de décision utilisés.

Résultats

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai (par ex., valeurs de l'opacité et de la DO₄₉₀ et IVIS calculé pour le produit chimique testé et les témoins positifs, négatifs et étalons [si inclus], y compris les données des essais répétés, le cas échéant, et la moyenne ± écart type pour chaque essai);
- description des autres effets observés;
- la classification *in vitro* selon le SGH de l'O.N.U le cas échéant.

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (3) OCDE (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Série sur les essais et l'évaluation n° 189, OCDE, Paris.
- (4) Nations Unies (2011). Système Général Harmonisé de l'Organisation des Nations Unies pour la Classification et l'étiquetage (SGH), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York et Genève: Nations Unies. Disponible à: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible à: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italie: Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. et Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
 - (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., et Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>
 - (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. et Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
 - (13) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Série sur les essais et l'évaluation N° 160. Adopté en octobre 2011. Paris: Organisation de coopération et de développement économiques.
 - (14) Doughty, M.J., Petrou, S. et Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
 - (15) Collee, J. et Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
 - (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., et Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
 - (17) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.
 - (18) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm
 - (19) OCDE (1998. Série sur les Principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes. Numéro 1: Les Principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997).
Disponible à http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Approche «bottom-up»: approche par étape utilisée pour un produit chimique pour lequel on anticipe qu'il ne relève d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves. Cette approche commence par la détermination des produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) par rapport aux autres produits chimiques (résultats positifs).

Approche «top-down»: approche par étape utilisée dans le cas d'un produit chimique pour lequel on estime qu'il provoque des lésions oculaires graves; cette approche commence par la détermination des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) par rapport aux autres produits chimiques (résultat négatif).

Catégorie 1 du SGH: Voir «Lésions oculaires graves»

Catégorie 2 du SGH: voir «Irritation oculaire»

Cornée: Partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

Danger: Propriété inhérente d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

Effets irréversibles sur l'œil: voir «Lésions oculaires graves».

Effets réversibles sur l'œil: voir «Irritation oculaire».

Essai à plusieurs niveaux: Démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique testé dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification des dangers, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique testé peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique testé ne peut pas être déterminé sur la base des informations existantes, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Fiabilité: Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite dans un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire.

Irritation oculaire: Production de changements dans l'œil suite à l'application d'un produit chimique sur la surface antérieure de l'œil et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application (2). L'expression est équivalente à «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH» (4).

Lésions oculaires graves: Lésions des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquées par l'application d'un produit chimique testé sur la surface antérieure de l'œil et qui ne sont pas totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application. L'expression est équivalente à «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH» (4).

Mélange: un mélange ou une solution composée d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles (4).

Mélange contenant des tensioactifs: Dans le contexte de la présente méthode d'essai, il s'agit d'un mélange contenant un ou plusieurs tensioactifs(s) à une concentration finale supérieure à 5 %.

Méthode d'essai validée: Méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

Non classé: produit chimique ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire (catégorie 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU) ou pour les lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU). L'expression est équivalente à «Sans catégorie SGH».

Opacité cornéenne: Mesure de l'étendue du caractère opaque de la cornée suite à son exposition à un produit chimique testé. Une augmentation de l'opacité cornéenne indique un endommagement de la cornée. L'opacité peut être évaluée de manière subjective, par exemple lors du test de Draize réalisé sur les yeux de lapin, ou de manière objective à l'aide d'un instrument de mesure tel qu'un «opacitomètre».

Opacitomètre: Instrument servant à mesurer l'«opacité cornéenne» en évaluant la quantité de lumière transmise à travers la cornée. En général, cet instrument est composé de deux compartiments, chacun disposant de sa propre source lumineuse et d'une cellule photoélectrique. L'un des compartiments est utilisé pour la cornée traitée tandis que l'autre sert à étalonner l'instrument et à le mettre à zéro. La lumière provenant d'une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique.

Perméabilité cornéenne: Mesure quantitative de l'endommagement de l'épithélium cornéen via la détermination de la quantité de fluorescéine sodique traversant toutes les couches cellulaires de la cornée.

Poids de la preuve: Prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique testé et d'étayer cette conclusion.

Précision: Degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place du terme «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique étalon: Produit chimique utilisé en tant que référence, en comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon doit présenter les propriétés suivantes: (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des produits chimiques soumis à l'essai; (iii) posséder des caractéristiques physiques/chimiques connues; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

Produit chimique testé: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Sans catégorie SGH: produit chimique qui ne relève d'aucune classification dans la catégorie 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH. Expression équivalente à «Non classé»

Score d'irritation in vitro (IVIS): Formule dérivée empiriquement et utilisée dans les essais OPCB, dans laquelle les valeurs d'opacité moyenne et de perméabilité moyenne pour chaque groupe de traitement sont combinées pour obtenir le score in vitro unique de chaque groupe de traitement. $IVIS = \text{valeur d'opacité moyenne} + (15 \times \text{valeur moyenne de perméabilité})$.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (4).

Substance: Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (4).

Tensioactif: Aussi appelé agent de surface; substance telle qu'un détergent, qui peut réduire la tension superficielle d'un liquide et donc lui permettre de mousser ou pénétrer des solides; aussi appelant agent mouillant.

Taux de faux négatifs: Proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: Proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule: Échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif: Réplique non traitée contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: Réplique contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, la sévérité de la réponse ne devra pas être **excessive**.

Appendice 2

VALEUR PRÉDICTIVE DE LA MÉTHODE D'ESSAI OPCB

Tableau 1

Valeur prédictive de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves [Cat. 1 ou Pas cat. 1 (Cat. 2 + «sans catégorie») du SGH de l'ONU / CLP de l'UE; Cat. I ou Pas cat. I (Cat. II + Cat. III + Cat. IV) de l'EPA des États-Unis]

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
SGH de l'ONU CLP de l'UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tableau 2

Valeur prédictive de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («non-irritants») [«sans catégorie» ou Pas «sans catégorie» (Cat. 1 + Cat. 2) du SGH de l'ONU / CLP de l'UE; Cat. IV ou Pas cat. IV (Cat. I + Cat. II + Cat. III) de l'EPA des États-Unis]

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
SGH de l'ONU CLP de l'UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA des États-Unis	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Appendice 3

PRODUITS CHIMIQUES A UTILISER POUR L'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE RELATIVE A LA MÉTHODE D'ESSAI OPCB

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en établissant correctement la classification des dangers pour l'œil présentés par les 13 produits chimiques préconisés dans le tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions selon le danger qu'ils représentent pour l'œil, sur la base des résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (LD 405) (17) et du SGH des Nations Unies (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou Non classé) (4). Les autres critères de sélection sont la disponibilité des produits chimiques dans le commerce, l'existence de données de référence in vivo de bonne qualité, et l'existence de données in vitro de bonne qualité obtenues grâce à la méthode OPCB. Les données de référence figurent dans le Récapitulatif simplifié (3) et dans les Background Review Documents de l'ICCVAM pour la méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (2)(18).

Tableau 1

Produits chimiques recommandés pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode d'essai OPCB

Produit chimique	N°CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification in vivo (2)	Classification OPCB
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide dibenzoyl-L-tartrique	2743-38-6	Acide carboxylique, Ester	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Imidazole	288-32-4	Hétérocyclique	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide trichloracétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl	4659-45-4	Halogénure d'acyl	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction précise/fiable n'est possible
Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Aucune prédiction précise/fiable n'est possible
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2 (3)	Aucune prédiction précise/fiable n'est possible
EDTA, sel dipotasique	25102-12-9	Amine, Acide carboxylique (sel)	Solide	Non classé	Non classé
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polyéther	Liquide	Non classé	Non classé

Produit chimique	N°CAS	Classe chimique ⁽¹⁾	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classification OPCB
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Halogénure d'acyle	Solide	Non classé	Non classé
Phénylbutazone	50-33-9	Hétérocyclique	Solide	Non classé	Non classé
Lauryl éther de polyoxyéthylène 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alcool	Liquide	Non classé	Non classé

Abréviations: N°CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Des catégories chimiques ont été assignées à chaque produit chimique selon un schéma de classification standard, basé sur le système de classification des National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponible à l'adresse: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ D'après les résultats issus de l'essai sur œil de lapin *in vivo* (LD OCDE 405) (17) et en utilisant le SGH de l'ONU (4).

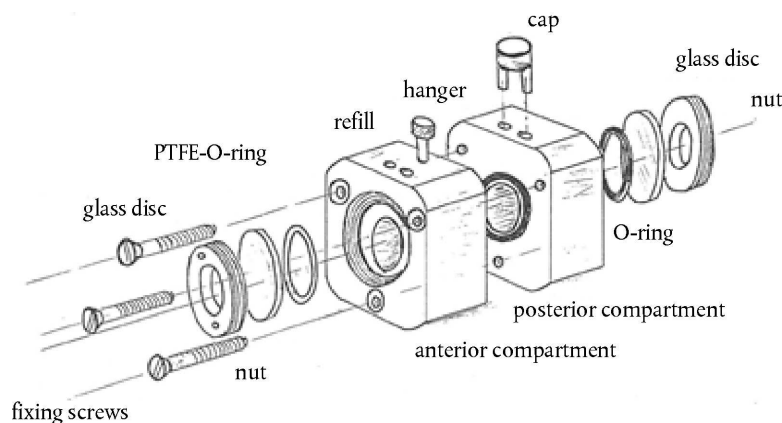
⁽³⁾ La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 sur 3 ou 2 sur 3 animaux le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* est menée sur 3 animaux. Tous les effets sauf une rougeur conjonctivale chez un animal avaient disparu le septième jour ou avant. Le seul animal chez lequel la rougeur n'avait pas disparu le septième jour (score de 1) était pleinement rétabli le dixième jour.

Appendice 4

LE PORTE-CORNÉE POUR LA MÉTHODE OPCB

Les porte-cornées pour OPCB sont fabriqués à partir d'un matériau inerte (polypropylène par exemple). Ils se composent de deux parties (une chambre antérieure et une chambre postérieure) et possèdent deux chambres internes cylindriques identiques. Chaque chambre, d'une contenance de 5 ml, est fermée par une vitre à travers laquelle les mesures d'opacité sont enregistrées. Chacune des chambres internes mesure 1,7 cm de diamètre et 2,2 cm de profondeur ⁽¹⁾. Un joint torique situé au niveau de la chambre postérieure empêche toute fuite. La cornée est placée face endothéliale dessous, sur le joint torique de la chambre postérieure, et la chambre antérieure est placée du côté épithélial de la cornée. Les chambres sont maintenues en place par trois vis en acier inoxydable situées sur les bordures extérieures du porte-cornée. Chaque chambre comporte à son extrémité une vitre amovible permettant d'accéder facilement à la cornée. Un joint torique placé entre la vitre et la chambre empêche toute fuite. L'introduction et le vidage du milieu et des produits chimiques d'essai se font par deux trous situés sur la face supérieure de chaque chambre. Pendant le traitement et les périodes d'incubation, ils sont fermés par des capuchons en caoutchouc. La transmission de la lumière à travers les porte-cornées peut varier dans la mesure où les effets de l'usure ou l'accumulation de certains résidus chimiques sur les trous des chambres internes ou sur les vitres peut modifier la répartition ou la réflectance de la lumière. En conséquence, on peut observer une augmentation ou une diminution de la lumière de référence transmise (et une variation inversement proportionnelle des mesures d'opacité de référence) à travers les porte-cornées, ces changements pouvant être marqués dès les premières mesures d'opacité de la cornée dans les chambres individuelles (autrement dit, les valeurs initiales d'opacité de la cornée dans des porte-cornées individuels spécifiques peuvent facilement varier de plus de 2 ou 3 unités d'opacité par rapport aux valeurs de référence attendues). Chaque laboratoire doit envisager d'élaborer un programme pour évaluer les variations de transmission de la lumière à travers les porte-cornées, selon la nature des produits chimiques testés et la fréquence d'utilisation des chambres. Pour établir des valeurs de référence, on peut contrôler les porte-cornées avant l'utilisation en routine en mesurant les valeurs d'opacité (ou de transmission de la lumière) de référence des chambres remplies de tout le milieu, sans cornées. Les porte-cornées peuvent ensuite être contrôlés périodiquement pour vérifier si la transmission de la lumière varie durant les périodes d'utilisation. Chaque laboratoire peut établir la fréquence de contrôle des porte-cornées, selon les produits chimiques testés, la fréquence d'utilisation et les variations observées par rapport aux valeurs d'opacité cornéenne de référence. Si l'on observe des variations notables de la lumière transmise à travers les porte-cornées, il convient d'appliquer les procédures appropriées de nettoyage et/ou de polissage de la surface interne des porte-cornées voire de la remplacer.

Porte-cornée: vue éclatée



⁽¹⁾ Les dimensions indiquées ici sont celles d'un porte-cornée utilisé pour des bovins âgés de 12 à 60 mois. Pour des animaux entre 6 et 12 mois, le porte-cornée est conçu de manière à posséder des chambres d'une contenance de 4 ml chacune et dont les dimensions intérieures sont de 1,5 cm de diamètre et 2,2 cm de profondeur. Pour tout porte-cornée nouvellement conçu, il est essentiel que le rapport entre la surface cornéenne exposée et le volume de la chambre postérieure soit le même que celui du porte-cornée classique. Cette condition est indispensable pour garantir que les valeurs de perméabilité sont correctement déterminées pour le calcul du SIIV par la formule donnée

Appendice 5

L'OPACITOMÈTRE

L'opacitomètre est un appareil permettant de mesurer la transmission de la lumière. Par exemple, dans le cas de l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France) utilisé pour valider la méthode OPCB, la lumière d'une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique. Les unités d'opacité sont alors définies. D'autres types d'opacitomètres présentant une configuration différente (par exemple, ne nécessitant pas de mesurer en parallèle le compartiment témoin et le compartiment expérimental) peuvent être utilisés s'il est prouvé qu'ils donnent des résultats similaires à ceux de l'équipement validé.

L'opacitomètre fournit une réponse linéaire par le biais d'un éventail de mesures d'opacité couvrant les seuils utilisés pour les différentes classifications décrites par le modèle de prévision (c'est-à-dire, jusqu'aux seuils déterminant le caractère corrosif/fortement irritant). Afin de garantir des mesures linéaires et précises jusqu'à 75-80 unités d'opacité, il est nécessaire d'étalonner l'opacitomètre à l'aide d'une série de calibreurs. Les calibreurs sont placés à l'intérieur de la chambre d'étalonnage (une chambre de porte-cornée destinée à contenir les calibreurs) et une mesure des calibreurs est réalisée sur l'opacitomètre. La chambre d'étalonnage est conçue pour maintenir les calibreurs approximativement à la même distance de la source lumineuse et de la cellule photoélectrique que celle où se trouveront les cornées lors des mesures d'opacité. Les valeurs de référence et le point déterminé initialement dépendent du type d'équipement utilisé. Il convient de s'assurer de la linéarité des mesures d'opacité en appliquant les procédures appropriées (en fonction de l'instrument). Par exemple, pour l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France), l'opacitomètre est tout d'abord étalonné à 0 unité d'opacité en utilisant la chambre d'étalonnage sans calibreur. Trois calibreurs différents sont ensuite placés l'un après l'autre à l'intérieur de la chambre d'étalonnage, et l'opacité est mesurée. Les calibreurs 1, 2 et 3 présentent des mesures d'opacité égales à leur valeur de consigne, soit respectivement 75, 150 et 225 unités d'opacité, $\pm 5\%$.

«B.48 Méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves et ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 438 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode d'essai sur œil de poulet isolé (OPI) a été évaluée par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis, en collaboration avec le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM), en 2006 et 2010 (1)(2)(3). La première évaluation a permis de valider scientifiquement l'utilité de la méthode OPI pour le dépistage des produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1) selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1)(2)(4) et du règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ⁽¹⁾. La seconde évaluation a consisté à déterminer l'utilité de la méthode OPI pour le dépistage des produits chimiques non classés comme irritants pour l'œil ou provoquant de graves lésions oculaires selon la définition du SGH de l'ONU (3) (4). Les résultats de l'étude de validation et les recommandations du panel d'examen ont confirmé la recommandation initiale selon laquelle il convient d'utiliser la méthode OPI pour la classification des produits chimiques pouvant provoquer de lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), car la base de données disponible était restée inchangée depuis la première validation de l'ICCVAM. À ce stade, il n'a pas été recommandé d'étendre le champ d'application de la méthode OPI pour inclure d'autres catégories. Le jeu de données in vitro et in vivo utilisé lors de l'étude de validation a été réévalué dans le but de déterminer l'utilité de la méthode OPI pour identifier les produits

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p.1.

chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (5). D'après les conclusions de cette réévaluation, la méthode OPI peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne relèvent d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave selon la définition du SGH de l'ONU (4) (5). La présente méthode d'essai indique les applications recommandées et les limites de la méthode OPI au regard de ces évaluations. Les principales différences entre la version originale de 2009 et la mise à jour de 2013 de la ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques concernent notamment: l'application de la méthode OPI pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification au titre du SGH de l'ONU, une mise à jour concernant les éléments du rapport d'essai, une mise à jour de l'appendice 1 sur les définitions, et une mise à jour de l'appendice 2 sur les substances d'épreuve.

Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer le test oculaire *in vivo* de Draize pour établir le degré d'irritation provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test oculaire de Draize (6). L'approche «top-down» (5) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant, alors que l'approche «bottom-up» (7) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante nécessitant une classification. La méthode OPI est une méthode d'essai *in vitro* pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières décrites aux paragraphes 8 à 10, pour classer et étiqueter les produits chimiques en fonction de leur caractère dangereux pour l'œil. Alors qu'elle n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin, la méthode OPI est recommandée comme première étape d'une stratégie d'essai telle que l'approche «top-down» suggérée par Scott et al. (7) pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, sans expérience supplémentaire (4). La méthode OPI est aussi recommandée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, ainsi que le définit le SGH de l'ONU («sans catégorie») (4), et peut donc être utilisée comme première étape dans le cadre d'une stratégie d'essai telle que l'approche «bottom-up» (7). Cependant, un produit chimique qui, avec la méthode OPI, semble ne causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification pour irritation oculaire/lésion oculaire grave nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires (*in vitro* et/ou *in vivo*) pour établir une classification définitive. En outre, les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre l'essai OPI dans une approche «bottom-up» dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU.

L'objectif de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel d'un produit chimique pour l'œil, mesuré par la propension du produit chimique à induire ou non une toxicité dans un œil de poulet énucléé. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par (i) une estimation qualitative de l'opacité, (ii) une estimation qualitative des dommages subis par l'épithélium, fondée sur l'application de fluorescéine sur l'œil (rétention de fluorescéine), (iii) une mesure quantitative de l'augmentation de l'épaisseur (gonflement), et (iv) une évaluation qualitative des dommages morphologiques macroscopiques infligés en surface. L'opacité cornéenne, le gonflement et l'estimation des dommages après exposition à un produit chimique d'essai sont évalués individuellement, puis combinés pour établir une classification d'effet irritant pour les yeux.

Les définitions des termes utilisés sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

La présente méthode d'essai est fondée sur le protocole suggéré dans le document d'orientation 160 de l'OCDE (8), élaboré à la suite de l'étude de validation internationale de l'ICCVAM (1)(3)(9), enrichie de contributions apportées par le Centre européen pour la validation des méthodes d'essais alternatives (ECVAM), le Centre japonais de validation des méthodes d'essais alternatives (JaCVAM), et le Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology du TNO (Pays-Bas). Le mode opératoire s'appuie sur des informations dérivées de protocoles publiés, et de celui actuellement employé par le TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données empiriques de cette étude totalisait 152 produits chimiques dont 72 substances et 80 mélanges (5). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des émulsions et des gels. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation.

La méthode OPI peut être utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce but, cette méthode présente pour limites un taux élevé de faux positifs pour les alcools et un taux élevé de faux négatifs pour les matières solides et les tensioactifs (1)(3)(9). Toutefois, le taux de faux négatifs (produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU mais identifiés comme n'en relevant pas) n'est pas préoccupant dans ce contexte car tous les produits chimiques d'essai qui donnent des résultats négatifs feraient ensuite l'objet d'un ou plusieurs autres essais in vitro dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. Il convient de relever que les solides peuvent entraîner des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation de l'œil in vivo de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (15). Les investigateurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un résultat positif indique un effet provoquant des lésions oculaires graves, autrement dit de classer le produit chimique d'essai dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire. Toutefois, il convient d'interpréter avec précaution les résultats positifs obtenus avec des alcools, compte tenu du risque de surestimation des résultats positifs.

Utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), la méthode OPI présente une précision d'ensemble de 86 % (120/140), un taux de faux positifs de 6 % (7/113) et un taux de faux négatifs de 48 % (13/27), en comparaison avec les données de la méthode d'essai in vivo sur les yeux de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (4)(5).

La méthode OPI peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave suivant le système de classification du SGH de l'ONU (4). Les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre l'essai OPI dans une approche «bottom-up» dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU. Cette méthode d'essai peut être utilisée pour tous les types de produits chimiques, un résultat négatif pouvant être accepté pour ne pas de classer un produit chimique pour irritation oculaire et lésion oculaire grave. Cependant, au regard d'un résultat de la base de données de validation, il est possible que les peintures antialissures contenant des solvants organiques soient sous-évaluées (5).

Utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent pas de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, la méthode OPI présente une précision d'ensemble de 82 % (125/152), un taux de faux positifs de 33 % (26/79) et un taux de faux négatifs de 1 % (1/73), en comparaison avec les données de la méthode d'essai in vivo sur œil de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (4)(5). Lorsque les produits chimiques d'essai de certaines catégories chimiques (à savoir, les peintures antialissures contenant des solvants organiques) sont exclus de la base de données, la précision de l'OPI est de 83 % (123/149), le taux de faux positifs de 33 % (26/78), et le taux de faux négatifs de 0 % (0/71) au regard du système de classification du SGH de l'ONU (4)(5).

La méthode OPI n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques d'essai qui devraient être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou catégorie 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques d'essai qui devraient être classés comme légèrement irritants pour l'œil (catégorie 2B du SGH de l'ONU) en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU sous-classés dans les catégories 2, 2A ou 2B, du SGH de l'ONU et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU surclassés dans les catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU. Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.

Tous les modes opératoires sur l'œil de poulet doivent respecter les réglementations applicables aux installations d'essai et les protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. L'usage des précautions universelles de laboratoire est recommandé (16).

Si la méthode OPI ne prend pas en considération les lésions conjonctivales et de l'iris évaluées par la méthode d'essai d'irritation oculaire chez le lapin, elle porte sur les effets observés sur la cornée qui sont les principaux critères de classification *in vivo* au regard du SGH de l'ONU. En outre, et bien qu'il soit impossible d'étudier la réversibilité des lésions cornéennes *per se* par la méthode d'essai OPI, on a proposé d'utiliser une estimation de la profondeur initiale d'une telle lésion afin de distinguer certains types d'effets irréversibles, en s'appuyant sur les études sur l'œil de lapin (17). En particulier, il apparaît nécessaire d'approfondir les connaissances scientifiques disponibles pour comprendre comment apparaissent les effets irréversibles non liés à une grave lésion initiale. Enfin, la méthode d'essai OPI ne permet pas l'évaluation du potentiel de toxicité systémique associé à une exposition oculaire.

La présente méthode d'essai sera périodiquement actualisée après examen de nouvelles informations et de nouvelles données. Par exemple, l'histopathologie peut s'avérer utile lorsqu'une caractérisation plus détaillée des lésions cornéennes est nécessaire. Pour évaluer cet éventuel développement, les utilisateurs sont invités à conserver les yeux et à préparer des échantillons pour l'histopathologie en vue d'établir une base de données et des critères de décision susceptibles d'améliorer la précision de cette méthode d'essai. L'OCDE a élaboré un document d'orientation sur l'utilisation des méthodes d'essai de toxicité oculaire *in vitro*, qui intègre des procédures détaillées sur la collecte des échantillons d'histopathologie et indique où soumettre les échantillons et/ou les résultats histopathologiques (8).

Tout laboratoire conduisant cet essai pour la première fois utilise les produits chimiques d'épreuve de compétence mentionnés à l'appendice 2. Il peut utiliser ces produits chimiques pour démontrer sa compétence technique en matière d'application de la méthode d'essai OPI préalablement à la soumission des données obtenues avec cet essai à des fins de classification réglementaire des dangers.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai OPI est un modèle organotypique qui permet le maintien à court terme d'yeux de poulet *in vitro*. Selon cette méthode, les dommages provoqués par le produit chimique d'essai sont évalués par détermination du gonflement, de l'opacité et de la rétention de fluorescéine de la cornée. L'observation des deux derniers paramètres est qualitative, alors que l'analyse du gonflement de la cornée est quantitative. Chaque mesure est reportée sous forme d'un score quantitatif utilisé pour calculer un indice d'irritation général, ou affectée à une catégorie qualitative utilisée pour appliquer une classification des produits chimiques dangereux pour l'œil *in vitro*, à savoir soit la catégorie 1 du SGH de l'ONU soit la catégorie Non classé du SGH de l'ONU. L'un ou l'autre de ces résultats peut ensuite être utilisé pour prédire si un produit chimique d'essai peut causer des lésions oculaires graves *in vivo* ou si elle ne nécessite aucune classification relative aux dangers des produits chimiques pour l'œil (se référer aux critères de décision). Cependant, on ne peut classer aucun produit chimique qui, avec la méthode OPI, ne semble causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification (voir le paragraphe 11).

Source et âge des yeux de poulet

Habituellement, on utilise dans cet essai des yeux prélevés sur des poulets provenant de l'abattoir où ils sont tués pour la consommation humaine, et les animaux de laboratoire sont donc inutiles. On utilise uniquement des yeux d'animaux sains dont l'entrée dans la chaîne alimentaire humaine est autorisée.

Aucune étude contrôlée visant à évaluer l'âge optimal des poulets n'a encore été menée, mais l'âge et le poids des poulets habituellement utilisés dans cette méthode d'essai sont ceux des petits poulets couramment traités dans un abattoir de volailles (à savoir, environ 7 semaines et 1,5 — 2,5 kg).

Collecte et transport des yeux au laboratoire

Les têtes sont coupées immédiatement après sédation des poulets, généralement par choc électrique, et incision des cous pour la saignée. Il conviendra d'identifier une source locale de poulets proche du laboratoire, afin que le transfert des têtes entre l'abattoir et le laboratoire soit suffisamment rapide pour limiter autant que possible la détérioration et/ou la contamination bactérienne. Il faut réduire au minimum l'intervalle qui sépare la collecte des têtes de poulets et le placement des yeux dans la chambre de surfusion suivant l'énucléation (généralement deux heures) pour assurer le respect des critères d'acceptation de l'essai. Tous les yeux utilisés dans l'essai proviennent d'un groupe d'yeux collectés le même jour.

Les yeux étant disséqués au laboratoire, les têtes sont transportées intactes depuis l'abattoir, à température ambiante (généralement entre 18 °C et 25 °C), dans des boîtes en plastique humidifiées par des tissus mouillés d'une solution saline isotonique.

Critères de sélection et nombre d'yeux utilisés dans la méthode OPI

Les yeux dont la coloration initiale par la fluorescéine ou le score d'opacité de la cornée sont élevés après énucléation (> 0,5 dans les deux cas) sont rejetés.

Chaque groupe de traitement et chaque groupe témoin positif parallèle comprend au moins trois yeux. Le groupe témoin négatif ou le témoin de solvant (si on utilise un solvant qui n'est pas une solution saline) comprend au moins un œil.

Dans le cas des matières solides se révélant non classées selon le SGH de l'ONU, il est recommandé de procéder à un second essai sur trois yeux afin de confirmer ou d'infirmer le premier résultat négatif obtenu.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation des yeux

Les paupières sont soigneusement excisées en veillant à ne pas endommager la cornée. L'intégrité de celle-ci est évaluée au moyen d'une goutte de fluorescéine sodique à 2 % (p/p) appliquée sur la surface cornéenne pendant quelques secondes, puis rincée par une solution saline isotonique. Les yeux traités à la fluorescéine sont examinés au biomicroscope pour vérifier si la cornée est ou non endommagée (ce qui se traduit par une rétention de fluorescéine et une opacité cornéenne $\leq 0,5$).

L'œil non endommagé est ensuite énucléé, en veillant à ne pas endommager la cornée. On tire le globe oculaire hors de l'orbite en maintenant fermement la membrane nictitante à l'aide de pinces chirurgicales, et les muscles de l'œil sont coupés avec des ciseaux courbes à pointes émoussées. Il est important d'éviter de léser la cornée par une pression excessive (artéfacts de compression).

Lorsque l'œil est retiré de l'orbite, une portion visible du nerf optique reste attachée. Une fois retiré de l'orbite, l'œil est placé sur un tampon absorbant et la membrane nictitante et le reste des tissus conjonctifs sont découpés.

L'œil énucléé est monté dans un clamp en acier inoxydable, en plaçant la cornée verticalement. Le clamp est ensuite transféré dans une chambre de l'appareil de surfusion (18). Dans l'appareil de surfusion, les clamps sont placés de telle sorte que la totalité de la cornée soit alimentée par le goutte-à-goutte de solution saline isotonique (3-4 gouttes par minute ou 0,1 à 0,15 ml/min). La température dans les chambres de l'appareil de surfusion est régulée à $32 \pm 1,5$ °C. L'appendice 3 propose un schéma d'un appareil de surfusion normal et des clamps pour œil, disponibles dans le commerce ou à construire. L'appareil peut être modifié en fonction des besoins d'un laboratoire particulier (par exemple, pour contenir un nombre d'yeux différent).

Une fois placés dans l'appareil de surfusion, les yeux sont à nouveau examinés au biomicroscope afin de s'assurer qu'ils n'ont pas été endommagés pendant le protocole de dissection. L'épaisseur de la cornée est mesurée à ce moment au sommet de la cornée au moyen du dispositif de mesure dont est muni le biomicroscope. Il faut remplacer les yeux (i) dont la rétention de fluorescéine est > 0,5, (ii) dont l'opacité cornéenne est > 0,5; ou (iii) qui présentent tout autre signe de lésion. Les yeux qui satisfont tous ces critères, mais dont l'épaisseur cornéenne s'écarte de plus de 10 % de la valeur moyenne calculée pour l'ensemble des yeux sont également rejetés. La mesure de l'épaisseur cornéenne peut varier en fonction du réglage de la largeur de la fente du biomicroscope, et les examinateurs tiennent compte de cette contrainte en ajustant cette largeur à 0,095 mm.

Une fois tous les yeux examinés et admis dans l'étude, ils sont incubés pendant environ 45 à 60 minutes pour s'équilibrer dans le système d'essai avant l'administration du produit chimique d'essai. Cette période est suivie des mesures au temps de référence zéro de l'épaisseur et de l'opacité cornéenne, qui serviront de mesures initiales (temps 0). Le score de fluorescéine à la dissection est la mesure initiale pour cet effet.

Application du produit chimique d'essai

Immédiatement après les mesures de référence au temps 0, l'œil (dans son support) est retiré de l'appareil de surfusion, placé en position horizontale et le produit chimique d'essai est appliquée sur la cornée.

Les produits chimiques liquides sont généralement testés sans dilution, mais ils peuvent être dilués si besoin est (par exemple, dans une étape du modèle de l'étude). Il est préférable d'utiliser une solution physiologique pour diluer les produits chimiques d'essai. Il est toutefois possible d'utiliser d'autres solvants en conditions contrôlées, sous réserve de démontrer le bien-fondé de leur utilisation au lieu de la solution physiologique saline.

Les produits chimiques liquides sont appliqués sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface; le volume habituel est de 0,03 ml.

Dans la mesure du possible, les produits chimiques solides sont broyés pour obtenir la plus grande finesse au moyen d'un mortier et d'un pilon, ou d'un outil de broyage comparable. La poudre est appliquée sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface; la quantité habituelle est de 0,03 mg.

Le produit chimique d'essai (liquide ou solide) est appliqué pendant 10 secondes, puis éliminée par rinçage de l'œil avec une solution saline isotonique (environ 20 ml) à température ambiante. L'œil (dans son support) est ensuite remis dans l'appareil de surfusion dans la position verticale originelle. En cas de besoin, il est possible d'effectuer un rinçage supplémentaire après l'application de 10 secondes ainsi qu'aux points de mesure ultérieurs (par exemple, si l'on découvre des résidus du produit chimique d'essai sur la cornée). En général, la quantité de solution saline utilisée en plus pour le rinçage n'est pas importante, contrairement en revanche à l'adhérence observée du produit chimique d'essai sur la cornée.

Produits chimiques témoins

Il convient d'inclure des témoins négatifs ou de solvant/véhicule et des témoins positifs concomitants dans chaque expérience.

Dans le cas d'essais de liquides purs ou de solides, on utilise une solution saline physiologique comme témoin négatif parallèle dans la méthode d'essai OPI pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable.

Lors des essais de liquides dilués, il convient d'inclure un groupe témoin de solvant/véhicule concomitants dans la méthode d'essai pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable. Comme le mentionne le paragraphe 31, il ne faut utiliser que des solvants ou des véhicules dont l'absence d'effet néfaste sur le système d'essai a été démontrée.

Chaque expérience comprend un produit chimique irritant connu en tant que témoin positif parallèle, afin de vérifier l'induction d'une réponse appropriée. Dans cette méthode d'essai, l'essai OPI a pour vocation d'identifier des produits chimiques ayant des effets irritants graves ou corrosifs; le témoin positif est donc un produit chimique de référence qui induit une réponse forte dans la méthode d'essai. Toutefois, afin d'assurer que la variabilité de la réponse du témoin positif au cours du temps peut être évaluée, l'ampleur de la réponse forte ne doit pas être excessive. Les données *in vitro* obtenues pour le témoin positif doivent être suffisantes pour permettre le calcul d'une gamme de réponse acceptable défini statistiquement. S'il n'existe pas de données antérieures adéquates issues de la méthode d'essai OPI pour un témoin positif donné, il peut être nécessaire de mener des études susceptibles de fournir ces informations.

L'acide acétique 10 % ou le chlorure de benzalconium 5 % sont des exemples de témoins positifs pour des produits chimiques d'essai liquides, tandis que l'hydroxyde de sodium ou l'imidazole peuvent jouer ce rôle pour les produits chimiques d'essai solides.

Les produits chimiques étalons sont utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus d'une catégorie chimique ou d'une catégorie de produits spécifique, ou pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'une substance irritante pour les yeux dans un intervalle spécifique de réponses irritantes.

Effets mesurés

Les cornées traitées sont évaluées avant le traitement et 30, 75, 120, 180, et 240 minutes (± 5 minutes) après le rinçage suivant le traitement. Ces points de mesure sont en nombre suffisant sur la période de traitement de 4 heures et les intervalles entre les mesures permettent d'effectuer les observations requises sur tous les yeux.

Les effets mesurés sont l'opacité cornéenne, le gonflement, la rétention de fluorescéine et les effets morphologiques (par exemple, piqûres ou relâchement de l'épithélium). Tous les effets mesurés, à l'exception de la rétention de fluorescéine (qui est déterminée uniquement avant le traitement et 30 minutes après l'exposition au produit chimique d'essai) sont déterminés à chaque point temporel indiqué ci-dessus.

Il est conseillé de prendre des photographies pour illustrer l'opacité cornéenne, la rétention de fluorescéine, les effets morphologiques et, le cas échéant, les observations histopathologiques.

Après l'examen final à quatre heures, il est recommandé de conserver les yeux dans un fixateur approprié (par exemple, formol tamponné à pH neutre) en vue d'un éventuel examen histopathologique (voir le paragraphe 14 et la référence (8) pour des explications détaillées).

Le gonflement cornéen est déterminé par des mesures d'épaisseur de la cornée réalisées au moyen d'un pachymètre optique monté sur un biomicroscope. Il est exprimé en pourcentage et calculé à partir de mesures de l'épaisseur de la cornée selon la formule suivante:

$$\left(\frac{\text{épaisseur de la cornée au temps } t - \text{épaisseur de la cornée au temps } = 0}{\text{épaisseur de la cornée au temps } = 0} \right) \times 100$$

Le pourcentage moyen de gonflement de la cornée pour tous les yeux est calculé à chaque point temporel observé. Un score de catégorie général est attribué à chaque produit chimique d'essai, dérivé du score moyen de gonflement de la cornée le plus élevé observé sur tous les points temporels (paragraphe 51).

Le score d'opacité cornéenne est calculé sur la surface de cornée qui est la plus fortement opacifiée comme le montre le tableau 1. La valeur moyenne d'opacité cornéenne pour tous les yeux est calculée pour chaque point temporel observé. Un score de catégorie général est attribué à chaque produit chimique d'essai, dérivé du score moyen d'opacité cornéenne le plus élevé observé sur tous les points temporels (paragraphe 51).

Tableau 1

Scores d'opacité cornéenne

Score	Observation
0	Aucune opacité
0,5	Très faible opacité
1	Zones d'opacité dispersées ou diffuses; détails de l'iris nettement visibles
2	Zone translucide aisément discernable; détails de l'iris légèrement masqués
3	Forte opacité cornéenne; aucun détail spécifique de l'iris n'est visible; la taille de la pupille est à peine discernable
4	Complète opacité cornéenne; l'iris est invisible

La rétention de fluorescéine est évaluée uniquement au point temporel d'observation de 30 minutes comme le montre le tableau 2. La valeur moyenne de rétention de fluorescéine est ensuite calculée pour tous les yeux observés au point d'observation de 30 minutes et utilisée pour déterminer le score de catégorie général de chaque produit chimique d'essai (paragraphe 51).

Tableau 2

Scores de rétention de fluorescéine

Score	Observation
0	Pas de rétention de fluorescéine
0,5	Coloration très mineure de cellules individuelles
1	Coloration de cellules individuelles éparses dans toute la zone traitée de la cornée
2	Coloration dense de foyers de cellules individuelles ou de cellules à confluence
3	Grandes zones confluentes de cornée retenant la fluorescéine

Les effets morphologiques comprennent la «piqûre» des cellules épithéliales cornéennes, le «relâchement» de l'épithélium, la «rugosité» de la surface cornéenne et l'«adhésion» du produit chimique d'essai sur la cornée. La gravité de ces effets est variable et ils peuvent être observés simultanément. Leur classification est subjective et dépend de l'interprétation de l'observateur.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

Les résultats d'opacité cornéenne, de gonflement et de rétention de fluorescéine sont évalués séparément et aboutissent à la détermination d'une catégorie OPI par effet mesuré. Ces catégories sont ensuite combinées en une classification d'effet irritant pour chaque produit chimique d'essai.

Critères de décision

Après évaluation de tous les effets, on peut assigner le produit chimique à une catégorie selon un barème prédéterminé. L'interprétation du gonflement de la cornée (tableau 3), de l'opacité (tableau 4) et de la rétention de fluorescéine (tableau 5) au moyen de 4 catégories d'OPI, suit les échelles indiquées ci-après. Il est important de relever que les scores de gonflement cornéen donnés au tableau 3 ne sont applicables que si l'épaisseur est mesurée au moyen d'un biomicroscope (Haag-Streit BP900, par exemple) par un dispositif de mesure de profondeur n° 1 avec un réglage de largeur de fente à 9½, soit 0,095 mm. Les utilisateurs tiennent compte du fait que les mesures d'épaisseur de cornée par un biomicroscope varient en fonction du réglage de la largeur de fente.

Tableau 3

Critères de classification OPI pour le gonflement de la cornée

Gonflement moyen de la cornée (%) (*)	Catégorie OPI
0 à 5	I
> 5 à 12	II

Gonflement moyen de la cornée (%) (*)	Catégorie OPI
> 12 à 18 (> 75 min après traitement)	II
> 12 à 18 (\leq 75 min après traitement)	III
> 18 to 26	III
> 26 à 32 (> 75 min après traitement)	III
> 26 à 32 (\leq 75 min après traitement)	IV
> 32	IV

(*) Score moyen le plus élevé observé sur tous les points temporels

Tableau 4

Critères de classification OPI pour l'opacité

Score moyen maximal d'opacité (*)	Catégorie OPI
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Score moyen maximal observé sur tous les points temporels (à partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 1).

Tableau 5

Critères de classification OPI pour la rétention moyenne de fluorescéine

Score de rétention moyenne de fluorescéine 30 minutes après traitement (*)	Catégorie OPI
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) À partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 2.

La classification in vitro d'un produit chimique d'essai est déterminée par la catégorie d'effet irritant qui correspond à la combinaison des catégories obtenues pour le gonflement cornéen, l'opacité cornéenne et la rétention de fluorescéine, ainsi que décrit au tableau 6.

Tableau 6

Classification générale des effets in vitro

Classification du SGH de l'ONU	Combinaison des 3 variables
Sans catégorie	3 × I 2 × I, 1 × II
Aucune prédiction n'est possible	Autre combinaison
Catégorie 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacité cornéenne ≥ 3 à 30 min (dans au moins deux yeux) Opacité cornéenne = 4 en un point temporel quelconque (dans au moins deux yeux) Relâchement important de l'épithélium (dans au moins un œil)

(*) Combinaisons moins probables.

Critères d'acceptation de l'étude

Un essai est considéré comme acceptable lorsque les témoins négatifs et de véhicule/solvant parallèles et les témoins positifs concurrents sont identifiés, respectivement, comme ne relevant pas de la classification du SGH et comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai contient les renseignements suivants, dès lors qu'ils s'appliquent à l'étude:

Produit chimique d'essai et produits chimiques témoins

- nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus;
- numéro d'enregistrement CAS (N°CAS), s'il est connu;
- pureté et composition du produit chimique d'essai/témoin [en pourcentage(s) par unité de poids], dans la mesure où cette information est disponible;
- propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;
- le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai et témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);
- stabilité (si connue);

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

- nom et adresse du commanditaire, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;
- identification de la source des yeux (par exemple, établissement auprès duquel ils ont été recueillis);

Conditions de la méthode d'essai

- description du système d'essai utilisé;

- biomicroscope (lampe à fente) utilisé (par exemple, modèle) et réglage de l'appareillage du biomicroscope;
- référence aux résultats témoins positifs et négatifs antérieurs et, le cas échéant, aux données antérieures démontrant les gammes de témoins de référence parallèles acceptables;
- procédure utilisée pour garantir l'intégrité (c'est-à-dire la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (par exemple, essais périodiques de substances d'épreuve des compétences);

Collecte et préparation des yeux

- âge et poids de l'animal donneur et, dans la mesure du possible, d'autres caractéristiques spécifiques des animaux sur lesquels ont été prélevés les yeux (par exemple, sexe, souche);
- stockage et conditions de transport des yeux (par exemple, date et heure du prélèvement, délai entre la collecte des têtes de poulet et le placement des yeux énucléés dans la chambre de surfusion);
- préparation et montage des yeux y compris les notifications relatives à leur qualité, la température des chambres où sont placés les yeux, et les critères de sélection des yeux utilisés pour l'essai;

Mode opératoire

- nombre de réplicats utilisés;
- identité des témoins négatifs et positifs utilisés (le cas échéant, aussi des témoins de référence et du solvant);
- dose, application et temps d'exposition du produit chimique d'essai utilisés;
- points temporels d'observation (avant et après traitement);
- description des critères d'évaluation et de décision utilisés;
- description des critères d'acceptation de l'étude utilisés;
- description de toutes les modifications du mode opératoire;

Résultats

- présentation sous forme de tableau des scores du gonflement cornéen, de l'opacité cornéenne et de la rétention de fluorescéine obtenus pour chaque œil et à chaque point temporel d'observation, y compris les scores moyens à chaque point d'observation pour tous les yeux testés;
- les scores moyens les plus élevés du gonflement cornéen, de l'opacité cornéenne et de la rétention de fluorescéine observés (tout point temporel confondu), et leur catégorie OPI correspondante;
- description de tous les autres effets observés;
- la classification du SGH in vitro retenue;
- le cas échéant, photographies de l'œil.

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ICCVAM (2007), Test Method Evaluation Report — In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm
- (2) ESAC (2007), Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible à l'adresse: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.

- (3) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible à l'adresse: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>
 - (4) Nations unies (2011), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Quatrième édition révisée, ONU, New York et Genève, 2011. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_f.html
 - (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Série sur les essais et les évaluations n° 188 (Parties 1 et 2), OCDE, Paris.
 - (6) Chapitre B.5 de la présente annexe OCDE (2012), Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.
 - (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010), A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
 - (8) OCDE (2011), Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 160, OCDE, Paris.
 - (9) ICCVAM. (2006), Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à l'adresse: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm
 - (10) Prinsen, M.K. et Koëter, B.W.M. (1993), Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
 - (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009), Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Disponible à l'adresse: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 - (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. et Spielmann H. (1995), The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
 - (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
 - (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
 - (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
 - (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. et Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à l'adresse: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
 - (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
 - (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.*- 19, 471-480.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Approche «bottom-up»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif).

Approche «top-down»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif).

Biomicroscope (lampe à fente): instrument utilisé pour examiner directement l'œil sous le grossissement d'un microscope binoculaire en créant une image stéréoscopique droite. Dans la méthode d'essai OPI, cet instrument est utilisé pour visualiser les structures antérieures de l'œil de poulet et également pour mesurer objectivement l'épaisseur de la cornée au moyen d'un dispositif adjoint de mesure de la profondeur.

Catégorie 1 du SGH: voir «Lésion oculaire grave» et/ou «Effets irréversibles sur l'œil».

Catégorie 2 du SGH: voir «Irritation oculaire» et/ou «Effets réversibles sur l'œil».

Cornée: partie transparente à l'avant du globe oculaire qui couvre l'iris et la pupille et laisse passer la lumière vers l'intérieur.

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Effets irréversibles sur l'œil: voir «Lésion oculaire grave» et «Catégorie 1 du SGH».

Effets réversibles sur l'œil: voir «Irritation oculaire» et «Catégorie 2 du SGH».

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire.

Gonflement cornéen: mesure objective dans l'essai OPI de l'ampleur de la distension de la cornée après exposition à un produit chimique d'essai. Elle est exprimée en pourcentage et calculée au moyen des mesures initiales (avant administration de la dose) d'épaisseur cornéenne, et des mesures d'épaisseur relevées à intervalles réguliers après exposition au produit chimique d'essai dans l'essai OPI. Le degré de gonflement cornéen est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Irritation oculaire: modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH de l'ONU» (4).

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH» (4).

Mélange: mélange ou solution composée de deux substances ou plus, qui ne réagissent pas entre elles (4)

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

Non classé: produit chimique qui n'est pas classé comme irritant oculaire (catégorie 2 du SGH de l'ONU) ou comme pouvant provoquer des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU). Interchangeable avec «Sans catégorie dans le SGH de l'ONU».

Opacité cornéenne: mesure de l'étendue de l'opacité de la cornée après exposition à un produit chimique d'essai. L'augmentation de l'opacité cornéenne est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Poids de la preuve: prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique et d'étayer cette conclusion.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Le terme est souvent utilisé indifféremment à la place du terme «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique: une substance ou un mélange

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Produit chimique étalon: produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon présente les propriétés suivantes: (i) source(s) régulière(s) et fiable(s); (ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des produits chimiques à tester; (iii) caractéristiques physiques et chimiques connues; (iv) données confirmant les effets connus; et (v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Rétention de fluorescéine: mesure subjective dans l'essai OPI de la quantité de fluorescéine sodique qui est retenue par les cellules épithéliales de la cornée après exposition à un produit chimique d'essai. Le degré de rétention de fluorescéine est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Sans catégorie dans le SGH de l'ONU: substances qui ne répondent pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU. Interchangeable avec «Non classé».

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (4).

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Substance: un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition (4).

Taux de faux négatifs: proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion des produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif: réplikat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: réplikat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec un produit chimique induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, la gravité de la réaction ne doit pas être excessive.

Tensioactif: aussi appelé agent tensioactif, il s'agit d'une substance, par exemple un détergent, capable de réduire la tension superficielle d'un liquide et de favoriser ainsi sa capacité à mousser ou à pénétrer les solides; il est aussi connu comme agent mouillant.

Appendice 2

PRODUITS CHIMIQUES POUR L'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE RELATIVE A LA MÉTHODE D'ESSAI OPI

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente méthode d'essai, les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de danger pour l'œil des 13 produits chimiques recommandés dans le tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions selon le danger qu'ils représentent pour l'œil, sur la base des résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (LD 405) et du SGH de l'ONU (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou «Sans catégorie») (4) (6). Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence in vivo de bonne qualité, et l'existence de données de bonne qualité issues de la méthode in vitro OPI constituent d'autres critères de sélection. Les données de référence sont disponibles dans le Récapitulatif simplifié (5) et dans les documents de l'ICCVAM (Background Review Documents) pour la méthode OPI (9).

Tableau 1

Produits chimiques recommandés pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode OPI

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique ⁽¹⁾	Forme physique	Classification in vivo ⁽²⁾	Classification in vitro ⁽³⁾
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide dibenzoyl-L-tartrique	2743-38-6	Acide carboxylique, Ester	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Imidazole	288-32-4	Hétérocyclique	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide trichloracétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction n'est possible ⁽⁴⁾
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2A ⁽⁵⁾	Aucune prédiction n'est possible ⁽⁴⁾
Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Aucune prédiction n'est possible ⁽⁴⁾
Diméthyl sulfoxyde	67-68-5	Composé organo-sulfuré	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie (limite)

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique ⁽¹⁾	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classification <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Méthylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbure (cyclique)	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbure (acyclique)	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
Triacétine	102-76-1	Lipide	Liquide	Non classé	Sans catégorie

Abréviations: N°CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service

- (¹) Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque produit chimique d'essai à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)
- (²) D'après les résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE n° 405) et en utilisant le SGH (ONU) (4)(6).
- (³) D'après les résultats obtenus avec la méthode OPI comme décrit au tableau 6.
- (⁴) Combinaison des scores OPI autres que ceux décrits au tableau 6 pour l'identification des produits ne relevant d'aucune catégorie du SGH ou relevant de la catégorie 1 du SGH (tableau 6).
- (⁵) La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 sur 3 ou 2 sur 3 animaux le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* est menée sur 3 animaux. Tous les effets sauf une rougeur conjonctivale chez un animal avaient disparu le septième jour ou avant. Le seul animal chez lequel la rougeur n'avait pas disparu le septième jour (score de 1) était pleinement rétabli le dixième jour.

«B.49 Test du micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 487 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai de toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succinctes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

Le test du micronoyau *in vitro* (MNvit) est un essai de génotoxicité consistant à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. Par conséquent, l'essai MNvit est une méthode *in vitro* qui, grâce à sa capacité de mise en évidence d'agents aneugènes et clastogènes, constitue un outil de base complet pour l'étude *in vitro* du potentiel de lésions chromosomiques (2) (3) dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai (voir paragraphe 13 pour des informations plus détaillées). Contrairement aux aberrations chromosomiques observées dans les cellules en métaphase, qui ne sont pas forcément transmises, les micronoyaux sont des lésions transmises aux cellules-filles. Dans les deux cas, les changements peuvent être incompatibles avec la survie des cellules.

La présente méthode d'essai autorise l'utilisation de protocoles incluant ou non la cytochalasine B (cytoB), un inhibiteur de polymérisation de l'actine. L'ajout de cytoB avant la mitose donne lieu à des cellules binucléées, ce qui permet l'identification et l'analyse des micronoyaux uniquement dans les cellules ayant effectué une mitose (4) (5). Cette méthode d'essai autorise également l'utilisation de protocoles ne mettant pas en jeu le blocage de la cytokinèse, à condition de pouvoir démontrer que la population cellulaire analysée a bien effectué une mitose.

Outre qu'il permet d'identifier des produits chimiques induisant la formation de micronoyaux, le test MNvit, associé au marquage immunochimique des kinétochores ou à l'hybridation avec sondes centromériques/télomériques [hybridation fluorescente *in situ* (FISH)], peut apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes à l'origine des lésions chromosomiques et de la formation de micronoyaux (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Ces procédures de marquage et d'hybridation peuvent être suivies lorsqu'une augmentation de la formation de micronoyaux est constatée et que l'investigateur souhaite déterminer si cette augmentation est le résultat d'événements clastogènes et/ou aneugènes.

Dans la mesure où les micronoyaux présents dans les cellules en interphase peuvent être évalués de façon relativement objective, le personnel du laboratoire a seulement besoin de déterminer le nombre de cellules binucléées en cas d'utilisation de la cytoB ainsi que l'incidence des cellules micronucléées dans tous les cas. L'examen des lames peut donc être relativement rapide, et l'analyse peut être automatisée. Chaque traitement permettant l'examen non plus de centaines mais de milliers de cellules, la puissance de l'essai s'en trouve accrue. Enfin, étant donné que les micronoyaux peuvent être issus de chromosomes retardataires, l'essai peut permettre de détecter la présence d'agents inducteurs d'aneuploidie, difficiles à étudier lors de tests d'aberration chromosomique classiques, tels que celui décrit dans le chapitre B.10 de la présente annexe (18). Toutefois, l'essai MNvit décrit dans la présente méthode d'essai ne permet pas de distinguer les produits chimiques modifiant le nombre de chromosomes et/ou la ploïdie de ceux induisant la clastogénicité sans avoir recours à des techniques spécifiques, telles que la méthode FISH citée au paragraphe 4.

L'essai MNvit est fiable et peut s'appliquer à plusieurs types de cellules, en présence ou en l'absence de cytoB. La validité de l'essai MNvit est attestée par de nombreuses données, et ce avec l'utilisation de différentes lignées cellulaires (cultures de lignées cellulaires ou de cellules primaires) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Ces données proviennent notamment des études internationales de validation coordonnées par la Société française de toxicologie génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) et des rapports de l'International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Les données disponibles ont en outre fait l'objet d'une nouvelle évaluation lors d'une étude de validation rétrospective fondée sur le poids de la preuve, réalisée par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) de la Commission européenne (CE), et la méthode d'essai a été déclarée scientifiquement valable par le comité consultatif scientifique de l'ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

Le test de micronoyaux *in vitro* sur cellules de mammifères peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires ou des cultures de cellules primaires d'origine humaine ou de rongeurs. Dans la mesure où la fréquence des micronoyaux généralement constatée pour un type de cellule aura une influence sur la sensibilité de l'essai, il est recommandé d'utiliser des types de cellules pour lesquelles la fréquence habituelle de formation de micronoyaux est stable et définie. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur capacité à bien se développer en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée de micronoyaux (40). Les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'émettre des recommandations fermes mais tendent à montrer qu'il importe de tenir compte, lors de l'évaluation des risques chimiques, du statut p53, de la stabilité génétique (caryotype), de la capacité de réparation de l'ADN et de l'origine (rongeurs ou humains) des cellules retenues pour l'essai. Les utilisateurs de la méthode d'essai sont donc invités à prendre en considération l'influence de ces caractéristiques cellulaires, et d'autres caractéristiques, sur les performances d'une lignée cellulaire quant à la détection de l'induction de micronoyaux, sachant que les connaissances évoluent dans ce domaine.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les produits chimiques testés, les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs ne reflétant pas la génotoxicité des produits chimiques d'essai. Ces conditions peuvent être une modification du pH (41) (42) (43) ou de l'osmolalité, une interaction avec le milieu de culture cellulaire (44) (45) ou une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 29).

Afin que l'analyse de l'induction de micronoyaux soit valable, il est essentiel que la mitose se soit produite aussi bien dans les cultures traitées et que dans les cultures non traitées. Pour que son intérêt soit maximal, l'examen des micronoyaux est effectué dans les cellules ayant achevé une mitose durant ou après l'application du produit chimique d'essai. Pour les nanomatériaux manufacturés, il est nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à la présente méthode d'essai, mais ces adaptations ne sont pas décrites dans le présent document.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Des cultures cellulaires d'origine humaine ou provenant d'autres mammifères sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines (voir paragraphe 19).

Durant ou après l'exposition au produit chimique d'essai, les cellules sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou d'autres effets sur le cycle cellulaire / la division cellulaire conduisent à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. Le produit chimique d'essai est normalement présent au cours de la mitose pour qu'il y ait induction d'une aneuploïdie. Les cellules récoltées en interphase sont teintées et soumises à analyse en vue de la détection de micronoyaux. En principe, l'examen des micronoyaux ne devrait être réalisé que dans les cellules ayant effectué une mitose durant l'exposition au produit chimique d'essai, ou pendant la période qui suit le traitement, si l'essai la prévoit. Dans les cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, il suffit de procéder à l'examen des cellules binucléées. En l'absence d'agent de blocage de la cytokinèse, il importe de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose, d'après l'augmentation de la population cellulaire, pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées. Le degré de cytotoxicité ou de cytotaxie induit par le produit chimique d'essai est évalué pour toutes les cultures dans lesquelles est réalisé l'examen des micronoyaux.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Cellules

Il est possible d'utiliser des cultures primaires de lymphocytes du sang périphérique humain ou d'autres mammifères (7) (20) (46) (47) et plusieurs lignées cellulaires issues de rongeurs telles que CHO, V79, CHL/IU, ainsi que les cellules L5178Y ou des lignées cellulaires humaines telles que les TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (voir paragraphe 6). D'autres lignées cellulaires telles que HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 et les cellules embryonnaires primaires de hamster doré (54) ont été utilisées pour des tests du micronoyau, mais elles n'ont pas encore été validées complètement. Par conséquent, le recours à ces types de lignées cellulaires doit être justifié via la démonstration de leur performance pour l'essai, ainsi qu'il est indiqué dans la section sur les critères d'acceptabilité. La CytoB est réputée pouvoir influencer sur la croissance des cellules L5178Y et n'est donc pas recommandée avec cette lignée cellulaire (23). En cas d'utilisation de cellules primaires, pour des raisons relatives au bien-être des animaux, il conviendra d'envisager, lorsque cela est possible, le recours à des cellules d'origine humaine, prélevées dans le respect des principes éthiques et de la réglementation en la matière.

Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), non fumeurs, ne souffrant d'aucune maladie connue et n'ayant pas été exposés récemment à des niveaux d'agents génotoxiques (produits chimiques, rayonnements ionisants, par exemple) susceptibles d'augmenter l'incidence de fond des cellules micronucléées, ceci afin de garantir que cette incidence soit faible et homogène. L'incidence des cellules micronucléées augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (55). Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. Il est nécessaire de démontrer que les cellules se sont divisées entre le moment où elles ont été traitées avec le produit chimique d'essai et leur prélèvement. Les cultures cellulaires sont maintenues dans une phase de croissance exponentielle (lignées cellulaires) ou encouragées à se diviser (cultures primaires de lymphocytes) en vue de l'exposition des cellules à différents stades du cycle cellulaire, étant donné que la sensibilité des phases cellulaires aux produits chimiques d'essai peut ne pas être connue. En général, les cellules primaires dont la division doit être stimulée par des agents mitogènes ne sont plus synchronisées lors de leur exposition au produit chimique d'essai (les lymphocytes humains après une stimulation mitogène de 48 heures, par exemple). L'utilisation de cellules synchronisées pendant le traitement avec le produit chimique d'essai n'est pas recommandée, mais peut être acceptable si elle est justifiée.

Milieu et conditions de culture

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ si nécessaire, température de 37°C) appropriées pour les cultures. La stabilité du caryotype (mode du nombre de chromosomes) et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires, et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire des lignées ou des cultures primaires utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées.

Préparation des cultures

Lignées cellulaires: les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle jusqu'au moment de la récolte (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

Lymphocytes: un sang total traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture (pendant 48 heures pour les lymphocytes humains, par exemple) en présence d'un mitogène [phytohémagglutinine (PHA) pour les lymphocytes humains, par exemple] afin d'induire une division cellulaire avant l'exposition au produit chimique d'essai et à la cytoB.

Activation métabolique

Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, à moins qu'un autre système soit justifié, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (56) (57) ou un mélange de phénobarbital et de β -naphthoflavone (58) (59) (60). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (61) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (58) (59) (60). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % v/v mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Pendant le traitement, on évitera d'utiliser des produits entraînant une réduction de l'indice mitotique, en particulier des complexants du calcium (62). Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

Les produits chimiques solides à tester sont préparés dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application. Les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement ou après dilution au système d'essai. Les produits chimiques gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients hermétiquement clos (63) (64) (65). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

Conditions de l'essai

Solvants

Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, et notamment sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que c'est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont des solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % v/v. Si la cytoB est dissoute dans du DMSO, la quantité totale de solvant organique utilisée à la fois pour le produit chimique d'essai et pour la cytoB ne doit pas dépasser 1 % (v/v); sinon, on aura recours à des témoins non traités afin de vérifier que le pourcentage de solvant organique n'a pas d'effet néfaste. Les solvants aqueux (solution saline ou eau) ne doivent pas dépasser 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant inhabituel (éthanol ou acétone, par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir appendice 1) ainsi que des témoins de solvant afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne pas d'effets délétères ou chromosomiques (aneuploidie ou clastogénicité, par exemple).

Utilisation de la cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse

Il est essentiel, pour garantir l'efficacité du test MNvit, que les cellules sur lesquelles est réalisé l'examen aient bien effectué une mitose durant le traitement ou pendant la période d'incubation qui suit le traitement, le cas échéant. L'examen des micronoyaux doit donc être limité aux cellules ayant effectué une mitose pendant ou après le traitement. La cytoB est l'agent le plus couramment utilisé pour bloquer la cytokinèse, car elle inhibe l'assemblage de l'actine, empêchant la séparation des cellules-filles après la mitose, d'où la formation de cellules binucléées (6) (66) (67). L'effet du produit chimique d'essai sur la cinétique de prolifération cellulaire peut être mesuré de façon concomitante, en cas de recours à la cytoB. L'usage de cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse est indiqué lors de l'utilisation de lymphocytes humains, car la durée du cycle cellulaire est variable selon les donneurs et parce que tous les lymphocytes ne réagissent pas à la stimulation par la PHA. La cytoB n'est pas obligatoire pour les autres types de cellules s'il peut être établi que ces cellules ont subi une division tel que décrit au paragraphe 27. En outre, la cytoB n'est généralement pas utilisée lorsque la formation de micronoyaux dans les échantillons est évaluée par le biais de la cytométrie en flux.

Pour chaque type de cellule, le laboratoire détermine la concentration de cytoB permettant d'obtenir la fréquence optimale de cellules binucléées dans les cultures témoins de solvant, et démontre qu'elle produit suffisamment de cellules binucléées pour que l'on puisse procéder à une analyse. La concentration appropriée de cytoB se situe habituellement entre 3 et 6 µg/ml (19).

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'essai

Lors de la détermination de la plus forte concentration du produit chimique d'essai, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 29), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 30) ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 9). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules traitées a effectué une mitose pendant l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphe 29). La cytotoxicité doit être mesurée lors de l'expérience principale avec et sans activation métabolique, au moyen d'un indicateur pertinent de mort et de croissance cellulaires (voir paragraphes 26 et 27). Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. S'il est réalisé, il ne doit pas remplacer la mesure de cytotoxicité effectuée dans le cadre de l'expérience principale.

L'application de cytoB sur les cultures et la mesure des fréquences relatives de cellules mononucléées, binucléées et multinucléées dans chaque culture offrent un moyen précis de quantifier l'effet d'un traitement sur la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique ou cytostatique (6) et de s'assurer que seules les cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'application sont observées au microscope. Il est conseillé de mesurer l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (cytokinesis-block proliferation index, CBPI) (6) (27) (68) ou l'indice de répliation (Replication Index, RI) à partir d'au moins 500 cellules par culture (voir les formules à l'appendice 2) pour estimer l'activité cytotoxique et cytostatique d'un traitement en comparant les valeurs obtenues pour les cultures traitées et les cultures témoins. L'évaluation d'autres indicateurs de cytotoxicité (intégrité cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, cycle cellulaire, etc.) peut fournir des informations utiles mais ne doit pas remplacer le CBPI ou le RI.

Dans les études sans cytoB, il est nécessaire de démontrer que les cellules mises en culture se sont divisées, de sorte qu'une proportion importante des cellules examinées aient effectué une division cellulaire durant ou après l'exposition au produit chimique d'essai, faute de quoi on risque de produire de fausses réponses négatives. La mesure du doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC) est recommandée pour évaluer l'activité cytotoxique et cytostatique d'un traitement (17) (68) (69) (70) (71) (voir formules à l'appendice 2). Lorsque les prélèvements s'étalent sur une longue durée (par exemple, lorsque la durée du traitement équivaut à 1,5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire et que la récolte a lieu à l'issue d'une durée équivalente après le traitement, ce qui engendre des moments d'échantillonnage allant au-delà de 3 à 4 fois la durée normale du cycle cellulaire au total (voir paragraphes 38 et 39), il se peut que le RPD sous-estime la cytotoxicité (71). Dans ces circonstances, la RICC pourrait constituer une meilleure mesure, mais l'évaluation de la cytotoxicité après une durée équivalente à 1,5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire fournit néanmoins une estimation précieuse. L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité ou de cytostase (intégrité cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, indice de prolifération, cycle cellulaire, ponts nucléoplasmiques ou bourgeons nucléaires, etc.) peut fournir d'autres informations utiles mais ne doit pas remplacer le RPD ni la RICC.

Il convient d'évaluer au moins trois concentrations d'essai (sans compter les témoins positifs et les témoins de solvant) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Quel que soit le type de cellules (lignées cellulaires ou cultures primaires de lymphocytes), chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée pour chaque concentration d'essai. Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandée, l'utilisation de cultures en exemplaire unique est aussi acceptée à condition que le nombre total de cellules analysées par concentration reste identique qu'il s'agisse de cultures uniques ou de répliques. L'utilisation de cultures uniques est pertinent en particulier lorsque quand on évalue plus de 3 concentrations (voir paragraphes 44-45). Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée peuvent être regroupés pour l'analyse des données. Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentration séparés par un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 29 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes de concentration-réponse à forte pente et, pour obtenir des données dans le cadre d'une cytotoxicité faible et modérée ou étudier la relation dose-réponse en détail, il faudra donc utiliser des concentrations plus rapprochées et/ou plus de trois concentrations (cultures uniques ou répliques), notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 60).

Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité de 55 ± 5 % selon les paramètres de cytotoxicité recommandés (à savoir une réduction de la RICC et du RPD pour les lignées cellulaires sans cytoB et une réduction du CBPI et de l'indice de réplication quand la cytoB est utilisée à 45 ± 5 % du témoin négatif concomitant) (72). Les résultats positifs présents uniquement dans la tranche la plus haute de la plage de cytotoxicité 55 ± 5 % doivent être interprétés avec prudence (71).

Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. A la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai (coloration ou analyse, par exemple). Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (73) (74) (75). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas d'une substance de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (UVCB) (76), de produits extraits de l'environnement, etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en l'absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (93).

Témoins

Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 21), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus à tous les moments de récolte.

Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire à identifier les clastogènes et les aneugènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Des exemples de témoins positifs figurent dans le tableau 1 ci-dessous. D'autres produits chimiques peuvent être utilisés comme témoins positifs, si cela est justifié.

À l'heure actuelle, aucun aneugène connu ne nécessite une activation métabolique pour présenter une activité génotoxique (17). Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés en ce qui concerne les traitements parallèles de courte durée effectués avec et sans activation métabolique pendant la même durée de traitement, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un clastogène nécessitant une activation métabolique. Dans ce cas, une seule réponse clastogène dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Toutefois, un traitement de longue durée (sans S9) doit disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Si un clastogène est sélectionné comme témoin positif unique pour le traitement de courte durée avec et sans activation métabolique, un aneugène devra être sélectionné pour le traitement de longue durée sans activation métabolique. Les témoins positifs tant pour la clastogénicité que pour l'aneugénicité sont utilisés pour des cellules métaboliquement compétentes ne nécessitant pas de préparation S9.

Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai (c'est-à-dire que les effets sont nets mais que l'identité des lames codées n'est pas évidente pour l'examineur), et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai.

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS
1. Clastogènes actifs sans activation métabolique		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	Oxyde de nitro-4-quinoléine	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS
3. Aneugènes		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

MODE OPÉRATOIRE

Déroulement du traitement

Afin d'augmenter au maximum la probabilité de détecter une action aneugène ou clastogène à un stade précis du cycle cellulaire, il importe qu'un nombre suffisant de cellules représentant la totalité des stades de leur cycle cellulaire soit traité avec le produit chimique d'essai. Toutes les applications débutent et s'achèvent pendant la phase de croissance exponentielle des cellules, et les cellules poursuivent leur croissance jusqu'au moment de l'échantillonnage. Le déroulement du traitement pour les lignées cellulaires et les cultures de cellules primaires peut donc différer quelque peu de celui appliqué pour les lymphocytes qui nécessitent une stimulation mitogène pour débiter leur cycle cellulaire (17). En ce qui concerne les lymphocytes, l'approche la plus efficace consiste à commencer le traitement avec le produit chimique d'essai 44 à 48 heures après la stimulation par la PHA, au moment où les cellules se divisent de manière asynchrone (6).

Les données publiées (19) indiquent que la plupart des aneugènes et clastogènes sont détectés à l'issue d'une application de courte durée, comprise entre 3 et 6 heures, en présence et en l'absence de préparation S9, suivie du retrait du produit chimique d'essai et d'une période de croissance équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire (7).

Toutefois, pour une évaluation complète, laquelle serait nécessaire pour conclure à un résultat négatif, les trois conditions expérimentales suivantes doivent être respectées pour un traitement de courte durée avec et sans activation métabolique et pour un traitement de longue durée sans activation métabolique (voir paragraphes 56, 57 et 58):

- Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai sans activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (19),
- Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai avec activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (19),
- Les cellules sont exposées en continu sans activation métabolique jusqu'au moment du prélèvement à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire.

Si l'une de ces conditions expérimentales entraîne une réponse positive, il n'est pas forcément nécessaire d'étudier les autres régimes de traitement.

S'il est connu ou supposé que le produit chimique d'essai affecte la durée du cycle cellulaire (par exemple si l'essai porte sur des analogues de nucléosides), notamment en ce qui concerne les cellules compétentes en p53 (35) (36) (77), les périodes d'échantillonnage et de récupération peuvent être prolongées d'une durée équivalente à 1,5 à 2,0 fois la durée normale du cycle cellulaire (soit au total 3,0 — 4,0 cycles cellulaires après le début des traitements de courte durée et de longue durée). Ces différents choix sont à faire en fonction des craintes d'interaction entre le produit chimique d'essai et la cytoB. En cas de recours à des périodes d'échantillonnage étendues (soit une durée de mise en culture équivalente au total à 3,0 — 4,0 cycles cellulaires), il faut veiller à ce que les cellules se divisent toujours activement. En ce qui concerne les lymphocytes, par exemple, la croissance exponentielle peut diminuer à partir de 96 heures après la stimulation et les cultures cellulaires monocouches peuvent devenir confluentes.

Les déroulements proposés pour le traitement des cellules sont résumés dans le tableau 2. Ces déroulements de traitement généraux peuvent être modifiés (et doivent être justifiés) en fonction de la stabilité et de la réactivité du produit chimique d'essai, ou des caractéristiques de croissance des cellules utilisées.

Tableau 2

Traitement des cellules et temps de récolte pour le test MNvit

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires traités avec application de cytoB	(avec S9) Traitement de courte durée	Traiter pendant 3 à 6 heures en présence de S9; éliminer la préparation S9 et le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter à l'issue de 1.5 — 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.
	(sans S9) Traitement de courte durée	Traiter pendant 3 à 6 heures; éliminer le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter à l'issue de 1.5 — 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.
	(sans S9) Traitement prolongé	Traiter pendant 1.5 — 2 fois la durée normale du cycle cellulaire en présence de cytoB; récolter à la fin de la période de traitement.

Lignées cellulaires traitées sans application de cytoB
(Mode de traitement identique à celui décrit ci-dessus, sauf que l'on n'ajoute pas de cytoB)

Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant le produit chimique d'essai. Si l'on constate une augmentation substantielle du nombre de cellules mitotiques par rapport aux témoins, ce qui indiquerait l'arrêt probable de la mitose, les cellules doivent être récoltées par centrifugation puis réintroduites dans les cultures, afin d'éviter de perdre les cellules en phase de mitose, et présentant un risque de micronoyaux / d'aberration chromosomique, au moment de la récolte.

Récolte des cellules et préparation des lames

Chaque culture doit faire l'objet d'une récolte et d'un traitement séparés. La préparation des cellules peut comporter un traitement hypotonique, mais cette étape n'est pas indispensable si les cellules sont correctement étalées d'une autre façon. Différentes techniques peuvent être employées pour la préparation des lames, à condition que les préparations cellulaires obtenues pour l'examen soient de très bonne qualité. On retiendra les cellules dotées d'une membrane intacte et d'un cytoplasme intact pour permettre la détection d'éventuels micronoyaux et (dans la méthode du blocage de la cytokinèse) le repérage fiable des cellules binucléées.

Les lames peuvent être colorées par différentes méthodes, au Giemsa ou à l'aide de colorants fluorescents spécifiques de l'ADN, par exemple. Le recours à des 'utilisation de colorants fluorescents appropriés [par exemple, l'acridine orange (78) ou l'Hoechst 33258 avec la pyronine-Y (79)] permet d'éliminer une partie des artefacts associés avec l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Les anticorps anti-kinétochore, la méthode FISH associée à des sondes ADN pancentromériques ou encore le marquage in situ par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié, peuvent être utilisés pour identifier le contenu des micronoyaux (les chromosomes entiers seront colorés tandis que les fragments de chromosomes acentriques ne le seront pas) si les informations d'ordre mécanistique concernant leur formation présentent de l'intérêt (16) (17). D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée et validée. Ainsi, pour certaines lignées cellulaires, la mesure des noyaux sub-2N en tant qu'événements hypodiploïdes à l'aide de techniques telles que l'analyse d'images, la cytométrie à balayage laser ou la cytométrie en flux pourrait également fournir des informations utiles (80) (81) (82). Les observations morphologiques des noyaux pourraient aussi donner des indications sur une aneuploïdie éventuelle. De plus, un essai d'aberrations chromosomiques dans les cellules en métaphase, portant de préférence sur le même type de cellules et suivant un protocole d'une sensibilité comparable, pourrait également se révéler utile pour déterminer si les micronoyaux sont dus à une cassure chromosomique (sachant qu'une perte chromosomique ne serait pas détectée au cours de l'essai d'aberration chromosomique).

Analyse

Toutes les lames, y compris celles des témoins de solvant et des témoins non traités (s'il y en a) et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope des fréquences de micronoyaux. Il convient d'employer des techniques appropriées pour contrôler les biais ou dérives en cas d'utilisation d'un système d'analyse automatique tel que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage laser ou l'analyse d'images. Quelle que soit la plate-forme automatisée utilisée pour examiner les micronoyaux, le CBPI, le RI, le RPD et la RICC doivent être évalués simultanément.

Dans les cultures traitées à la cytoB, la fréquence des micronoyaux est analysée dans un minimum de 2 000 cellules binucléées par concentration et par témoin (83), réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires ou répliques. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 28), il y a lieu d'examiner au moins 2 000 cellules binucléées par culture (83). Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture (pour les cultures dupliquées) ou à 2 000 (pour une culture en un seul exemplaire), et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins cytotoxiques, suivant la situation. Il convient également de veiller à ne pas examiner les cellules binucléées ayant une forme irrégulière ou dont les deux noyaux présentent une différence de taille trop importante. En outre, les cellules binucléées ne doivent pas être confondues avec des cellules multinucléées mal étalées. Les cellules possédant plus de deux noyaux principaux ne sont pas analysées, car la fréquence de référence des micronoyaux est susceptible d'être plus élevée dans ce type de cellules (84). L'examen des cellules mononucléées peut être envisagé s'il s'avère que le produit chimique d'essai interfère avec l'action de la cytoB. Dans ce cas, il peut se révéler utile de répéter l'essai sans cytoB. L'examen des cellules mononucléées outre celui des cellules binucléées pourrait fournir des informations utiles (85) (86), mais n'est pas obligatoire.

En ce qui concerne les lignées cellulaires, lorsque l'essai est réalisé sans cytoB, l'examen des micronoyaux doit porter sur un minimum de 2 000 cellules par concentration d'essai (83) et par témoin, réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 28), il y a lieu d'examiner au moins 2 000 cellules binucléées par culture. Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture (pour les cultures dupliquées) ou à 2 000 (pour une culture en un seul exemplaire), et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins cytotoxiques, suivant la situation.

Lorsque l'essai est réalisé en présence de cytoB, il convient de déterminer un CBPI ou un indice de réplication (RI) afin d'évaluer la prolifération cellulaire (voir appendice 2), en utilisant 500 cellules au moins par culture. Lorsque les traitements sont effectués en l'absence de cytoB, il est essentiel de faire la preuve que les cellules en culture se sont divisées (voir paragraphes 24 à 28).

Compétence du laboratoire

Afin d'acquérir une expérience suffisante de l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des produits chimiques positifs de référence agissant selon des mécanismes variés (au moins un avec activation métabolique et un sans activation métabolique, et un agissant selon un mécanisme aneugène, et sélectionné parmi les produits chimiques énumérés au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (y compris des cultures non traitées et divers solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 49 à 52.

Une sélection de produits chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter les produits chimiques clastogènes et aneugènes, déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et démontrer la pertinence des procédures d'examen (analyse visuelle au microscope, cytométrie en flux, cytométrie à balayage laser ou analyse d'images). Il conviendra de définir une plage de concentrations des produits chimiques sélectionnés qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données historiques

Le laboratoire doit établir:

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques,
- une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, de solvant) historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (87) (88). La base de données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent utiliser des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (88)) afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (83). On trouve dans la littérature (87) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser les données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence des données avec les bases de données historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des cellules micronucléées issues d'une seule culture ou de l'ensemble des cultures réalisées en plusieurs exemplaires, comme décrit au paragraphe 28. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (87) (88). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est « sous contrôle » (voir paragraphe 50) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

Lorsque la technique du blocage de la cytokinèse est employée, seules les fréquences des cellules binucléées présentant des micronoyaux (indépendamment du nombre de micronoyaux par cellule) sont utilisées pour évaluer l'induction de micronoyaux. L'analyse des cellules présentant un ou plusieurs micronoyaux peut être rapportée séparément; elle peut apporter des informations utiles, mais n'est pas obligatoire.

Il convient d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et/ou de cytostase pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs et positifs (16). On calculera également le CBPI ou l'indice de réplication (RI) pour toutes les cultures traitées et témoins, afin de mesurer le retard du cycle cellulaire en cas de recours à la méthode de blocage de la cytokinèse. En l'absence de cytoB, il convient de mesurer le doublement relatif de la population (RPD) ou l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) (voir appendice 2).

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

- Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 50).
- Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 50) induisent des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants
- Les critères de prolifération cellulaire dans le témoin de solvant sont remplis (voir paragraphes 25-27)
- Toutes les conditions expérimentales ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphes 36-40).
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (voir paragraphes 28 et 44-46).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 24-31.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphes 36-39):

- au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (89)
- un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose dans au moins une condition expérimentale (voir paragraphe 28)
- des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 52).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (90) (91) (92).

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphes 36-39)

- aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
- un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,
- l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple voir paragraphe 52).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (90) (91) (92).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations, autres conditions d'activation métabolique (concentration de S9 ou origine de S9), par exemple].

Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif, et le résultat sera déclaré équivoque.

Lorsque des produits chimiques d'essai induisent la formation de micronoyaux lors de l'essai MNvit, celle-ci est due soit à une cassure chromosomique, soit à une perte chromosomique, soit aux deux événements combinés. Il est possible de procéder à d'autres analyses à l'aide d'anticorps anti-kinétochores, de sondes centromériques in situ ou d'autres méthodes afin de déterminer si le mécanisme d'induction de micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot et date limite d'utilisation, si c'est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;
- réactivité du produit chimique d'essai avec le solvant/véhicule ou le milieu de culture cellulaire;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Solvant:

- justification du choix du solvant;
- pourcentage de solvant dans le milieu de culture final

Cellules:

- type et source des cellules utilisées;
- raisons du choix du type cellulaire utilisé;
- absence de mycoplasmes, pour les lignées cellulaires;
- pour les lignées cellulaires, informations sur la durée du cycle cellulaire ou l'indice de prolifération;
- en cas d'utilisation de lymphocytes, sexe, âge et toute autre information pertinente sur les donateurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène employé;
- durée normale du cycle cellulaire (témoin négatif);
- nombre de passages, le cas échéant, pour les lignées cellulaires;
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, pour les lignées cellulaires;
- nombre modal de chromosomes, pour les lignées cellulaires;

Conditions de l'essai:

- identité de l'éventuel agent de blocage de la cytokinèse utilisé (cytoB, par exemple), sa concentration et la durée d'exposition des cellules;
- concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);
- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;
- composition du milieu, concentration de CO₂ le cas échéant, degré d'humidité;
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture;
- température et temps d'incubation;
- durée du traitement;
- délai de récolte après traitement;
- densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant;
- type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9 (activité enzymatique, stérilité, capacité métabolique, par exemple);
- produits chimiques témoins positifs et négatifs, concentrations finales, conditions et durée des périodes de traitement et de récupération;
- méthodes de préparation des lames et technique de coloration utilisées;
- critères d'analyse des cellules micronucléées (choix des cellules analysables et identification du micronoyau);
- nombre de cellules analysées;

- méthodes de mesure de la cytotoxicité;
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;
- méthode(s) d'analyse statistique utilisée(s);
- méthodes, telles que le recours aux anticorps anti-kinétochores ou aux sondes centromériques, utilisées pour déterminer si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats:

- définition des cellules acceptables pour l'analyse;
- en l'absence de cytoB, nombre de cellules exposées et nombre de cellules récoltées pour chaque culture en cas de lignées cellulaires;
- mesures de la cytotoxicité, par exemple CBPI ou RI dans le cas de la méthode de blocage de la cytokinèse; RICC ou RPD lorsque la méthode de blocage de la cytokinèse n'est pas utilisée; autres observations le cas échéant (degré de confluence cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, fréquence des cellules binucléées);
- signes de précipitation et moment de la détermination;
- données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées;
- répartition des cellules mono-, bi- et multinucléées en cas d'utilisation d'une méthode de blocage de la cytokinèse;
- nombre de cellules micronucléées, donné séparément pour chaque culture traitée et culture témoin, en précisant si elles proviennent de cellules binucléées ou mononucléées, s'il y a lieu;
- relation concentration-réponse, si possible;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;
- données relatives aux témoins négatifs (avec solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, et nombre de données;
- analyse statistique; valeurs p le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016), "Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015". Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) Chapitre B.10 de la présente annexe: *Essai in vitro d'aberration chromosomique sur cellules de mammifère.*
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.

- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, disponible à l'adresse: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. disponible à l'adresse: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 271-283.

- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponible à l'adresse: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooley (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surralles, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhrer, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) OCDE (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponible sur demande.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de OECD, Série sur les essais et l'évaluation, n°198, OCDE, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "In vitro micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aneugène: produit chimique ou processus qui, via des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose: mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'annexe 2).

Cellules en interphase: cellules qui ne sont pas en phase de mitose.

Centromère: région de l'ADN d'un chromosome où les deux chromatides sont reliées entre elles et sur laquelle les deux kinétochores sont fixés côte à côte.

Clastogène: produit chimique ou événement induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations cellulaires ou des organismes eucaryotes.

Concentrations: désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytokinèse: processus de division cellulaire survenant immédiatement après la mitose pour former deux cellules-filles, contenant chacune un noyau unique.

Cytostase: inhibition de la croissance cellulaire (voir formule à l'appendice 2).

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai effectués en présence de cytochalasine B, la cytotoxicité correspond à une baisse de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou de l'indice de réplication (RI) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 26 et appendice 2).

Pour les essais visés par la présente méthode d'essai effectués en l'absence de cytochalasine B, la cytotoxicité correspond à une baisse du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 27 et appendice 2).

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Fraction S9 de foie: surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000g (extrait de foie cru).

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications de nucléotides, réarrangements, mutations génétiques, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice de prolifération (Proliferation Index, PI): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI): proportion de cellules issues de la deuxième division dans la population traitée par rapport au témoin non traité (voir formule à l'appendice 2).

Indice de réplication (Replication Index, RI): rapport entre le nombre de cycles de division cellulaire achevés dans une culture traitée et ce même nombre dans le témoin non traité, au cours de la période d'exposition et la récupération (voir formule à l'appendice 2).

Indice mitotique: nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération cellulaire dans cette population.

Kinétochore: assemblage de protéines situé au niveau du centromère d'un chromosome, auquel sont associées les fibres fusoriales lors de la division cellulaire, permettant le mouvement ordonné des chromosomes-fils vers les pôles des cellules-filles.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Micronoyau: petit noyau, venant s'ajouter au noyau principal de la cellule et séparé de celui-ci, formé lors de la télophase de la mitose ou de la méiose à partir de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes retardataires.

Mitose: division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Non-disjonction: non-séparation d'une paire de chromatides, qui ne parviennent donc pas à migrer correctement lors de la division cellulaire, ce qui entraîne la présence d'un nombre anormal de chromosomes dans les cellules-filles.

Polypléidie: aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Prolifération cellulaire: augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Statut p53: la protéine p53 intervient dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Les cellules déficientes en protéine fonctionnelle p53, incapables d'arrêter le cycle cellulaire ou d'éliminer les cellules lésées par le biais de l'apoptose ou d'autres mécanismes (induction de la réparation de l'ADN, par exemple) liés aux fonctions de p53 en réponse à des lésions de l'ADN, devraient théoriquement être davantage sujettes aux mutations génétiques ou aux aberrations chromosomiques.

Témoin de solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoin non traité: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

Appendice 2

FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ

En cas d'utilisation de la cytoB, l'évaluation de la cytotoxicité se fonde sur l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou sur l'indice de réplication (RI) (17) (69). Le CBPI indique le nombre moyen de noyaux par cellule, et peut servir au calcul de la prolifération cellulaire. Le RI indique le nombre relatif de cycles cellulaires par cellule effectués au cours de la période d'exposition à la cytoB dans les cultures traitées par rapport aux cultures témoins, et peut servir au calcul du pourcentage de cytostase:

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

Avec:

T = culture traitée avec le produit chimique d'essai

C = culture témoin

Où:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Nb de cellules mononucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules binucléées}) + (3 \times \text{Nb de cellules multinucléées}))}{(\text{nombre total de cellules})}$$

Ainsi, un CBPI égal à 1 (toutes les cellules sont mononucléées) équivaut à une cytostase de 100 %.

Cytostase = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) / (\text{nombre total de cellules})_T}{((\text{nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) / (\text{nombre total de cellules})_C} \times 100$$

T = cultures traitées

C = cultures témoins

Ainsi, un RI de 53 % signifie que, par rapport au nombre de cellules ayant effectué une division cellulaire pour former des cellules binucléées et multinucléées dans la culture témoin, 53 % seulement de ces cellules ont effectué une division dans la culture traitée, soit une cytostase de 47 %.

En l'absence d'utilisation de cytoB, l'évaluation de la cytotoxicité sur la base de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou du doublement relatif de la population (RPD) est recommandée (69), ces deux mesures tenant compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées}(\text{final} - \text{initial}))}{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures témoins}(\text{final} - \text{initial}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures traitées})}{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures témoins})} \times 100$$

Où:

Doublement de population = $[\log (\text{nombre de cellules post-application} \div \text{nombre de cellules initial})] \div \log 2$

Par exemple, une RICC ou un RPD de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 %.

En utilisant l'**indice de prolifération (PI)**, on peut évaluer la cytotoxicité via le comptage du nombre de clones composés de 1 cellule (cl1), 2 cellules (cl2), 3 à 4 cellules (cl4) et 5 à 8 cellules (cl8).

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

Le PI est également un paramètre fiable et utile de cytotoxicité pour les lignées cellulaires cultivées in vitro en l'absence de cytoB (25) (26) (27) (28) et peut être considéré comme un autre paramètre utile.

Quoi qu'il en soit, il convient de mesurer le nombre de cellules avant traitement, qui doit être identique dans les cultures traitées et les cultures témoins négatives.

Le RCC (à savoir nombre de cellules dans les cultures traitées / nombre de cellules dans les cultures témoins) était utilisé auparavant comme paramètre de cytotoxicité mais n'est plus recommandé car il peut induire une sous-estimation de la cytotoxicité.

En cas d'utilisation de systèmes d'analyse automatique tels que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage laser ou l'analyse d'images, le nombre de noyaux peut remplacer le nombre de cellules dans la formule.

Dans les cultures témoins négatives, le doublement de la population ou l'indice de réplication doivent être compatibles avec l'obligation de prélever des cellules à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.»

▼ **M3****B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA**

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE), a été mise à jour (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode ELGL s'appuie un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application lorsque l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: DA (développé par Daicel Chemical Industries, Ltd.) est une variante non radioactive de l'ELGL, qui quantifie l'adénosine triphosphate (ATP) par bioluminescence pour estimer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: DA a été validée, et évaluée et recommandée par un comité international d'examen, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances d'essai ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12) (13). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (14). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE) et ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE), sont toutes plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et la LD 406 de l'OCDE (14) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.
2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: DA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En revanche, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour détecter les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: DA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances d'essai susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans des limites spécifiques. Cela n'implique pas que l'ELGL: DA doive systématiquement remplacer l'ELGL ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure

▼ M3

chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL: DA avec la substance d'essai considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: DA (voir paragraphe 5), et aider à choisir les doses appropriées.

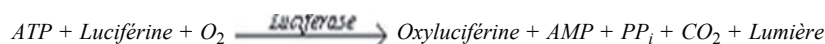
5. La méthode ELGL: DA, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (14). En outre, l'ELGL: DA propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE (51), l'ELGL: DA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. Malgré les avantages de l'ELGL: DA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (14), certaines limites peuvent imposer de privilégier le chapitre B.6 ou la LD 406 de l'OCDE [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai.] De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances d'essai comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (16) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: DA (10). Il se peut en outre que la méthode ELGL: DA ne convienne pas aux substances qui modifient les niveaux d'ATP (c'est-à-dire qui agissent comme inhibiteurs de l'ATP) ou perturbent la quantification précise de l'ATP intracellulaire (par exemple, présence d'enzymes dégradant l'ATP, présence d'ATP extracellulaire dans le ganglion lymphatique). Dans ces limites, l'ELGL: DA est applicable à toute substance d'essai qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1,8 et 2,5 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 44 substances présentant un $IS \geq 1,8$ (voir paragraphe 6), l'ELGL: DA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour trois des 12 substances non sensibilisantes présentant des indices de stimulation compris entre 1,8 et 2,5 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: DA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 1,8, on peut

▼ **M3**

ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de l'ATP par bioluminescence (facteur connu pour être en corrélation avec le nombre de cellules vivantes) (17) pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage (18) (19). Cette technique par bioluminescence utilise l'enzyme luciférase pour catalyser la formation de lumière à partir d'ATP et de luciférine selon la réaction suivante:



L'intensité de la lumière émise suit une pente linéaire en fonction de la concentration en ATP, et se mesure à l'aide d'un luminomètre. L'essai luciférine-luciférase constitue une méthode précise pour quantifier l'ATP et trouve de nombreuses applications (20).

DESCRIPTION DE L'ESSAI**Choix des espèces animales**

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: DA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/J, qui sera donc privilégiée pour cet essai (12) (13). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL: DA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (21), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances d'essai solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances d'essai liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances d'essai insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

▼ M3**Contrôle de la fiabilité**

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible aux sensibilisants pour lesquels l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL: DA. En conséquence, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL: DA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation d'au moins 1,8 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 10 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (N° CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: DA et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL: DA est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL: DA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que tester le TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent sera réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (22).

▼ **M3**

15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive; 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'utilisation d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (23). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concurrent.
16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances appartenant à une classe chimique particulière, ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substance. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:
 - similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester,
 - caractéristiques physiques et chimiques connues,
 - données obtenues avec l'ELGL: DA,
 - données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE**Nombre d'animaux et doses**

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un groupe TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.
18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (2) et (24). Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée est scientifiquement justifié. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (24) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).
19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1 v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veille tout particulièrement à ce que les substances hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

▼ **M3**

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (22). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: DA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: DA lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: DA, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin de l'essai (huitième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose), le septième jour (24 heures avant la fin) et le huitième jour. De plus, au huitième jour cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaissement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: DA principale sera la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2

▼ M3

Observation	Résultat
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (26) (27), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (31) (32) (33) (34).
24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: DA principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, pilo-érection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilette modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le huitième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (36).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:
- *Premier jour*: Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer une solution aqueuse de sodium lauryl sulfate (SLS) à 1 % au dos de chaque oreille à l'aide d'un pinceau trempé dans la solution de SLS de manière à couvrir l'ensemble de la surface externe en quatre à cinq applications. Une heure après le traitement au SLS, appliquer 25 µL d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15), au dos de chaque oreille.
 - *Deuxième, troisième et septième jours*: Répéter le prétraitement avec la solution aqueuse de SLS à 1 % puis l'application de la substance d'essai en suivant la même procédure que le premier jour.
 - *Quatrième, cinquième et sixième jours*: Aucun traitement.
 - *Huitième jour*: Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Environ 24 à 30 heures après le début des applications du septième jour, euthanasier les animaux. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (22). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

▼ M3**Préparation des suspensions cellulaires**

26. Pour chaque souris, on prépare une suspension de cellules isolées provenant des ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement en plaçant ces ganglions entre deux lames de verres sur lesquelles on exerce une légère pression pour écraser les échantillons. Après avoir vérifié que le tissu est bien étalé, séparer les deux lames. Pour disperser le tissu présent sur ces lames dans le PBS, incliner chacune d'elle au-dessus de la boîte de Pétri, puis racler le tissu avec un grattoir à cellules tout en rinçant avec la solution. Les ganglions lymphatiques des animaux TN étant petits, il convient de les traiter avec soin pour éviter tout artefact sur les valeurs IS. Le volume total de PBS utilisé pour rincer les deux lames est de 1 mL. Homogénéiser doucement la suspension de CGL dans la boîte de Petri à l'aide du grattoir à cellules. Prélever alors une aliquote de 20 µL de suspension homogénéisée à l'aide d'une micropipette en prenant soin de ne pas capter la membrane, visible à l'œil nu, puis mélanger cette aliquote avec 1,98 mL de PBS pour obtenir un échantillon de 2 mL. Un second échantillon de 2 mL est ensuite préparé selon la même procédure de façon à en obtenir deux par animal.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de l'ATP des lymphocytes)

27. Les augmentations de la teneur en ATP des ganglions lymphatiques sont déterminées par la méthode luciférine/luciférase avec un kit de mesure de l'ATP qui calcule la bioluminescence, exprimée en unités relatives de luminescence [relative luminescence unit] (RLU). Le temps écoulé entre la mise à mort de l'animal et la quantification de l'ATP pour chaque individu demeure uniforme, et ne dépasse pas environ 30 minutes, car la teneur en ATP est supposée diminuer progressivement à partir de l'euthanasie (12). Ainsi, l'ensemble des procédures entre l'excision des ganglions lymphatiques auriculaires et les mesures d'ATP seront réalisées en 20 minutes d'après un programme préétabli valable pour tous les animaux. Il convient de déterminer la luminescence due à l'ATP dans chacun des échantillons de 2 mL, soit deux mesures d'ATP par souris. La moyenne de ces résultats est alors établie et utilisée dans les calculs suivants (voir paragraphe 30).

OBSERVATIONS**Observations cliniques**

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (36).

Poids corporels

29. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant la moyenne des RLU/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des RLU/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

▼ M3

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque $IS \geq 1,8$ (10). Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite (c'est-à-dire un IS situé entre 1,8 et 2,5) est jugé positif (2) (3) (37).
32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,8 et 2,5), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (4).
33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple, comparaisons par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de William pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

RÉSULTATS ET RAPPORTS**Résultats**

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les RLU pour chaque animal, la moyenne des RLU/animal pour chaque groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

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

Substance et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

- données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),
- s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

- données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),
- justification du choix du véhicule.

▼ M3

Animaux d'essai:

- source des souris CBA,
- état microbiologique des animaux, s'il est connu,
- nombre et âge des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

- source, numéro de lot, données fournies par le fabricant sur l'assurance qualité/le contrôle qualité du kit ATP,
- détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,
- justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),
- concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,
- détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture et provenance de l'eau),
- détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,
- méthodes de détermination de la toxicité,
- critères de décision concernant les études positives ou négatives,
- détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

- résumé des résultats du plus récent test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,
- résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule),
- en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultat:

- poids corporel de chaque souris au lancement du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,
- moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée au site d'administration, pour chaque animal,
- heure de la mise à mort de l'animal et heure de la mesure d'ATP pour chaque animal,
- tableau des RLU et IS par souris pour chaque groupe de dose,
- moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des RLU/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux,

▼ **M3**

- indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins,
- relation dose-effet,
- analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

- bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
2. Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].
7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.
8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]

▼ M3

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf].
12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. et Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
13. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. et Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
14. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
15. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
16. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
17. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. et Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. et Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
19. Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. et Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
20. Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
21. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7^e édition. Washington, DC: National Academies Press.
22. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-perf/LLNAPerfStds.pdf]
23. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
24. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
25. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice No. 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]

▼ **M3**

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
27. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
31. Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
33. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
34. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
35. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
36. OCDE (2000), Guidance Document on the 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. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
37. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.
38. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]

▼ M3

Appendice 1

DÉFINITIONS

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Faux négatif: substance identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active.

Faux positif: substance identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive.

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (38).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (38).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de pré-validation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (38).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (38).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) source(s) régulières et fiables; ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester; iii) caractéristiques physico-chimiques connues; iv) données confirmant les effets connus; et v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼ **M3****B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA**

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE) a été révisée (1) et chapitre B.42 de la présente annexe). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode ELGL s'appuie sur un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application dans les régions où l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée] constitue une variante non radioactive de la méthode d'essai ELGL, qui fait appel à la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 59-14-3) non radiomarquée dans un essai de type ELISA pour mesurer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: BrdU-ELISA a été validée, puis évaluée et recommandée par un groupe international d'experts indépendants, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de produits chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE) et ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE), sont plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et dans la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.
2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: BrdU-ELISA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En contrepartie, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour repérer les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: BrdU-ELISA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances chimiques susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans un cadre précis. Cela n'implique pas que l'ELGL: BrdU-ELISA doive systématiquement remplacer l'ELGL classique ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de procéder à l'essai, le

▼ **M3**

laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL: BrdU-ELISA avec la substance d'essai considérée [étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: BrdU-ELISA (voir paragraphe 5)], et aider à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL: BrdU-ELISA, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (13). En outre, l'ELGL: BrdU-ELISA propose un raffinement important de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE, l'ELGL: BrdU-ELISA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hyper-sensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL: BrdU-ELISA ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (chapitre B.6 de la présente annexe, 13). Cette méthode permet donc de réduire le stress des animaux. Malgré les avantages de l'ELGL: BrdU-ELISA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13), certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances chimiques comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (15) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: BrdU-ELISA (10). Dans ces limites, l'ELGL: BrdU-ELISA est applicable à tout produit chimique qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1,6 et 1,9 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 43 substances présentant un $IS \geq 1,6$ (voir paragraphe 6), l'ELGL: BrdU-ELISA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour deux des 11 substances non sensibilisants (d'après ELGL) présentant un indice de stimulation compris entre 1,6 et 1,9 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: BrdU-ELISA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle dans le groupe TV concurrent pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale

▼ M3

à 1,6, on peut ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de la BrdU pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage. La BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore de la même manière dans l'ADN de cellules en prolifération. L'incorporation de la BrdU est quantifiée par ELISA, grâce à un anticorps spécifique de la BrdU marqué par la peroxydase. Cette enzyme réagit ensuite avec un substrat ajouté spécialement pour produire un composé coloré, dosé avec un lecteur de plaque de microtitrage à une absorbance donnée.

DESCRIPTION DE L'ESSAI**Choix des espèces animales**

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: BrdU-ELISA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/JN, qui sera donc privilégiée pour cet essai (10) (12). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minimale entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL: BrdU-ELISA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (16), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances chimiques solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances chimiques liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances chimiques insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les

▼ M3

autorités concernées avant de mener l'ELGL: BrdU-ELISA. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL: BrdU-ELISA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation supérieur d'au moins 1,6 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 14 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (N° CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v). Dans certains cas, d'autres témoins positifs répondant aux critères susmentionnés pourront être employés, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: BrdU-ELISA et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL: BrdU-ELISA est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).
13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL: BrdU-ELISA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou des réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis à contribution, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements seront documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une autre base de données afin d'évaluer la cohérence des nouveaux résultats relatives au TP.
14. Les investigateurs gardent à l'esprit que tester le TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe du TP concurrent sera réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (17).
15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive, 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'essai avec un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (18). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concurrent.

▼ **M3**

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de composés. Les substances étalons adaptées présentent les propriétés suivantes:

- similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester,
- caractéristiques physiques et chimiques connues,
- données obtenues avec l'ELGL: BrdU-ELISA,
- données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance et un TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.
18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références 2 et 19. Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriées telles que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée est scientifiquement justifié. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (19) (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).
19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas un biais dans les résultats du test. Il doit être choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veille tout particulièrement à ce que les substances d'essai hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

▼ **M3**

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (17). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: BrdU-ELISA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: BrdU-ELISA lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et les suspensions.
22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: BrdU-ELISA, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin de l'essai (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, au sixième jour, cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (21) (22). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: BrdU-ELISA principale sera la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2

▼ M3

Observation	Résultat
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaissement de l'oreille de 25 % (21) (22), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (25) (26) (27) (28) (29).
24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (30) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: BrdU-ELISA: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (31).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:
- *Premier jour*: Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µL d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille.
 - *Deuxième et troisième jours*: Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.
 - *Quatrième jour*: Aucun traitement.
 - *Cinquième jour*: Injecter 0,5 mL (5 mg/souris) d'une solution de BrdU (10 mg/mL) par voie intrapéritonéale.
 - *Sixième jour*: Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Euthanasier les animaux environ 24 heures (24 h) après l'injection de BrdU. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (17). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

▼ **M3****Préparation des suspensions cellulaires**

26. Pour chaque souris, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire (par exemple en broyant les ganglions dans un mortier en plastique jetable avant de les passer dans un tamis en nylon de 70 microns). La procédure de dispersion des CGL constitue une étape cruciale de l'essai, et est maîtrisée préalablement par chaque opérateur. En outre, les ganglions lymphatiques des animaux du groupe TN étant petits, il importe de les manipuler avec précaution afin d'éviter toute perturbation des valeurs IS. Dans chaque cas, le volume de suspension de CGL visé correspond à un volume optimisé préétabli (environ 15 mL). Le volume optimisé est celui pour lequel l'absorbance moyenne du groupe TN se situe entre 0,1 et 0,2.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de la BrdU dans l'ADN des lymphocytes)

27. La BrdU est quantifié à l'aide d'un kit de dosage ELISA commercial (par exemple Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne, référence 11 647 229 001). Placer rapidement 100 µL de suspension de CGL dans les puits d'une microplaque à fond plat, en triplicats. Après fixation et dénaturation des CGL, ajouter les anticorps anti-BrdU dans chaque puits et laisser réagir. Éliminer ensuite les anticorps anti-BrdU par lavage, puis ajouter la solution de substrat et laisser le chromogène être synthétisé. Mesurer l'absorbance à 370 nm, pour une longueur d'onde de référence fixée à 492 nm. Dans tous les cas, il convient d'optimiser les conditions de l'essai (voir paragraphe 26).

OBSERVATIONS**Observations cliniques**

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation excessive ou de corrosion locale de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (31).

Poids corporels

29. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant l'indice de marquage BrdU moyen de chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par l'indice de marquage BrdU moyen du groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

L'indice de marquage BrdU est calculé comme suit:

$$\text{Indice de marquage BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{blancem}}) - (\text{ABS}_{\text{réf}} - \text{ABS}_{\text{blancréf}})$$

Où em = longueur d'onde d'émission et réf = longueur d'onde de référence.

▼ M3

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque $IS \geq 1,6$ (10). Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite (c'est-à-dire un IS situé entre 1,6 et 1,9) est jugé positif (3) (6) (32).
32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,6 et 1,9), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (4).
33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple, comparaisons par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de William pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

RÉSULTATS ET RAPPORTS**Résultats**

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les indices de marquage BrdU pour chaque animal, la moyenne des indices de marquage BrdU/animal pour chaque groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

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

Substance et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

- données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),
- s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

- données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),
- justification du choix du véhicule.

▼ M3

Animaux d'essai:

- source des souris CBA,
- état microbiologique des animaux, s'il est connu,
- nombre et âge des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

- source, numéro de lot et données du fabricant en matière d'assurance et de contrôle qualité (sensibilité et spécificité des anticorps, limites de détection) pour le kit ELISA,
- détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,
- justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),
- concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,
- détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture et provenance de l'eau),
- détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,
- méthodes de détermination de la toxicité,
- critères de décision concernant les études positives ou négatives,
- détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

- résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,
- résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule),
- en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

- poids corporel de chaque souris au lancement du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,
- moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal,
- tableau des indices de marquage BrdU et IS par souris pour chaque groupe de traitement,
- moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des indices de marquage BrdU par souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux,

▼ **M3**

- indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins,
- relation dose-effet,
- analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

- bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
2. Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM), NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Biochem. Pharmacol.*, 34, 3-258.
8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249- 257.
10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA), NIH Publication No. 10-7552A/B, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]

▼ M3

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.pdf]
12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. et Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay, *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
13. OCDE (1992), *Sensibilisation de la peau*, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
14. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
15. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
17. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ns/LLNAPerfStds.pdf]
18. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
19. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
20. OCDE (2002), *Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Ligne directrice n° 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
21. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96 (S-1), 235.
22. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
23. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
25. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼ **M3**

26. Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
27. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, *Toxicol.*, 212, 60-68.
28. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
29. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfisteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
30. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/Tox_workshop.htm].
31. OCDE (2000), *Guidance Document on the 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. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
32. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
33. OCDE (2005), *Guidance Document on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Série sur les essais et évaluations No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]

▼ **M3***Appendice 1*

DÉFINITIONS

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (33).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (33).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (33).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (33).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de pré-validation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (33).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (33).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) source(s) régulières et fiables; ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester; iii) caractéristiques physiques et chimiques connues; iv) données confirmant les effets connus; et v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼ **M4****B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 436 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice pour les essais de toxicité aiguë par inhalation (403) avait été adoptée en 1981 et a été révisée depuis [voir chapitre B.2 de la présente annexe (1)]. À la suite de l'adoption, en 2001, de la méthode par classe de toxicité aiguë par voie orale [chapitre B.1 *ter* de la présente annexe (5)], il est apparu approprié de développer une méthode par classe de toxicité aiguë par inhalation (2) (3) (4). Une évaluation rétrospective des performances de la méthode d'essai par classe de toxicité aiguë pour la toxicité aiguë par inhalation a montré que cette méthode était utilisable à des fins de classification et d'étiquetage (6). La méthode d'essai pour les essais de toxicité par inhalation faisant appel à la méthode par classe de toxicité aiguë permettra l'utilisation d'étapes successives de concentrations cibles fixées pour déterminer la classe de toxicité de la substance d'essai. Bien que la létalité soit le principal effet mesuré, les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance ou de détresse sévère sont euthanasiés afin de minimiser leur souffrance. Des précisions concernant les effets mesurés éthiquement acceptables sont disponibles dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE (7).
2. On trouvera dans le document d'orientation n° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation des indications pour la conduite et l'interprétation de la présente méthode d'essai (8).
3. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai figurent à l'appendice 1 et dans le document d'orientation n° 39 (8).
4. Cette méthode d'essai fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement de la substance d'essai conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification pour les substances présentant une toxicité aiguë (9). Si des estimations ponctuelles des valeurs de la CL₅₀ ou des analyses de la courbe concentration- réponse sont nécessaires, il convient de se reporter au chapitre B.2 de la présente annexe (1). Pour plus d'informations sur le choix des méthodes d'essai, il convient de se reporter au document d'orientation n° 39 (8). La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester des articles spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité *in vitro* ou *in vivo* auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées. Les concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance ou une détresse sévères, du fait de propriétés corrosives⁽¹⁾ ou fortement irritantes, ne sont pas testées à l'aide de cette méthode d'essai, voir document d'orientation 39 (8).

⁽¹⁾ L'évaluation de la corrosivité peut reposer sur un avis d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal, données (*in vitro*) existantes [voir, par exemple, le chapitre B.40 (11) de la présente annexe ou la ligne directrice 435 de l'OCDE (12), valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente].

▼ **M4****PRINCIPE DE L'ESSAI**

6. Le principe de cet essai est d'obtenir, avec un processus séquentiel, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë par inhalation de la substance d'essai, pour parvenir à son classement avec une exposition de 4 heures. Des objectifs réglementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. Les essais pour chacun des niveaux de concentration définis porteront sur 3 animaux de chaque sexe. En fonction de la mortalité et/ou de l'état moribond des animaux, 2 étapes peuvent suffire pour permettre de juger de la toxicité aiguë de la substance d'essai. S'il est prouvé que l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, l'essai peut se poursuivre avec seulement les animaux de ce sexe. Le résultat de l'étape précédente détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:
- a) l'arrêt de l'essai;
 - b) un essai sur trois animaux par sexe; ou
 - c) un essai sur 6 animaux, tous du sexe le plus sensible à la substance d'essai, la limite inférieure de la classe de toxicité devant être déterminée à partir d'essais portant sur 6 animaux par groupe de concentration d'essai, indépendamment du sexe.
7. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés, et sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (7).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Choix des espèces animales**

8. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

9. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder, pour chaque sexe, $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

10. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données

▼ **M4**

génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol par la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

11. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais elle est justifiée dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (8) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

12. Il est recommandé une durée fixe d'exposition de quatre heures, sans compter le temps d'équilibration. D'autres durées d'exposition sont possibles pour répondre à des besoins spécifiques, cependant une justification devra être apportée dans le rapport d'étude, voir document d'orientation 39 (8). Les animaux exposés «corps entier» demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.
13. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

14. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm , avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0 (8) (13) (14). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide du tractus respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

▼ M4**Préparation de la substance d'essai dans un véhicule**

15. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale l'eau est choisie de préférence. Les substances particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

16. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude de la substance d'essai préparée dans un véhicule, celui-ci est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION**Débit d'air dans la chambre d'exposition**

17. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, suivi en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de la production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul» lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (8) (15). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

18. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier» l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est suivie et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour les durées plus courtes. Le taux d'humidité relative est idéalement compris entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple, dans le cas d'un mélange à base d'eau), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

▼ M4**Substance d'essai: concentration nominale**

19. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

20. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.
21. Il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
22. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible, et suivie soit en continu, soit par intermittence en fonction de la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, la prochaine concentration d'essai devra utiliser quatre échantillons par exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95} . Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (8).

▼ **M4**

23. Pour des mélanges très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (8).

Substance d'essai: répartition granulométrique

24. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade ou un autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (8). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 14).

MODE OPÉRATOIRE**Essai principal**

25. Pour chaque étape, trois animaux de chaque sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, seront utilisés. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le niveau de concentration à utiliser comme dose initiale est choisi parmi les quatre niveaux fixés; le niveau de concentration initiale est celui le plus susceptible de présenter une toxicité pour certains des animaux traités. Les schémas d'essai pour les gaz, les vapeurs et les aérosols (présentés dans les appendices 2 à 4) correspondent aux essais effectués aux valeurs limites des catégories 1 à 4 du règlement relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage (9), pour les gaz (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (appendice 2), pour les vapeurs (0,5, 2, 10, 20 mg/1/4 h) (appendice 3) et pour les aérosols (0,05, 0,5, 1, 5 mg/1/4 h) (appendice 4). La catégorie 5, que ne prévoit pas le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), se rapporte à des concentrations dépassant les concentrations limites respectives. Chacune des concentrations de départ possède son propre schéma d'essai. En fonction du nombre d'animaux morts ou euthanasiés, le mode opératoire d'essai suit les flèches indiquées jusqu'à ce qu'une catégorisation puisse être établie.
26. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition des animaux au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Il est recommandé d'espacer de trois à quatre jours les expositions à chaque niveau de concentration afin de permettre l'observation d'une toxicité retardée. L'intervalle de temps peut être ajusté, par exemple en cas de réponses peu concluantes.

▼ M4**Essai limite**

27. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé; le document d'orientation 39 fournit de plus amples informations à ce sujet (8).
28. Selon le mode opératoire normal, trois animaux par sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont exposés à des concentrations de 20 000 ppm pour les gaz, 20 mg/l pour les vapeurs et 5 mg/l pour les poussières/brouillards. Si elles sont atteintes, ces concentrations servent de limite d'essai pour la présente méthode d'essai. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (8). Selon le SGH (16), il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites, pour des raisons de bien-être des animaux. Les essais en catégorie 5 du SGH (16), non prévue par le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine, et une justification est alors fournie dans le rapport d'essai. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

OBSERVATIONS

29. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec les effets liés au traitement. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

▼ M4

30. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différenciation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

31. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci, et au moins les jours 1, 3 et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite) ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveillera donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 % ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

Pathologie

32. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
33. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Les organes examinés peuvent être ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue et ceux montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Résultats**

34. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

▼ **M4****Rapport d'essai**

35. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

- description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,
- espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- méthode de randomisation,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),
- description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai:

- nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),
- données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

- justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),
- données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

- description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,
- source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,
- équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,
- source d'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,
- méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,
- différence de pression (positive ou négative),
- orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans le système («corps entier»),
- homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,
- situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,
- débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»),
- informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,

▼ M4

- temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),
- nombre de changements de volume par heure,
- doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

- justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,
- concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),
- concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,
- toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.); les unités de volume (ppm, ppb) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses,
- répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

- détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des substances solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,
- description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,
- détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),
- justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

- tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g ,
- tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité et durée des effets),
- poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,

▼ **M4**

- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,
- classement dans les catégories du règlement (CE) n° 1272/2008 et valeur limite de la CL₅₀.

Discussion et interprétation des résultats:

- un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,
- la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,
- la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,
- la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés,
- une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (7).

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Chapitre B.2 de la présente annexe, Toxicité aiguë (inhalation).
- (2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., and Schlede E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.
- (3) Diener W., Kayser D. and Schlede E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.
- (4) Diener W. and Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129-134.
- (5) Chapitre B.1 *ter* de la présente annexe, Toxicité orale aiguë — méthode de la classe de toxicité aiguë.
- (6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 105, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (9) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼ M4

- (10) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).
- (11) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine.
- (12) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
- (15) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167
- (16) Nations unies (2007), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), ST/SG/AC.10/30, Nations unies, New York et Genève. Disponible sur l'internet (http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html).

▼ M4

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ M4*Appendice 2***Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des gaz (ppm/4 h)**Remarques générales ⁽¹⁾

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 2 bis: concentration initiale de 100 ppm.

Appendice 2 ter: concentration initiale de 500 ppm.

Appendice 2 quater: concentration initiale de 2 500 ppm.

Appendice 2 quinquies: concentration initiale de 20 000 ppm.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

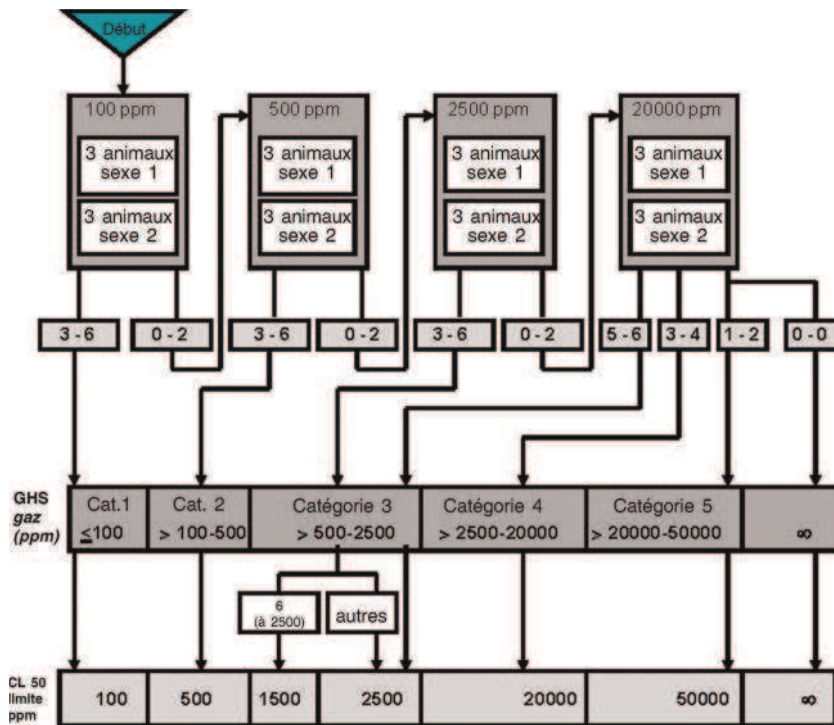
⁽¹⁾ Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼ M4

Appendice 2 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 100 ppm/4 h pour les gaz



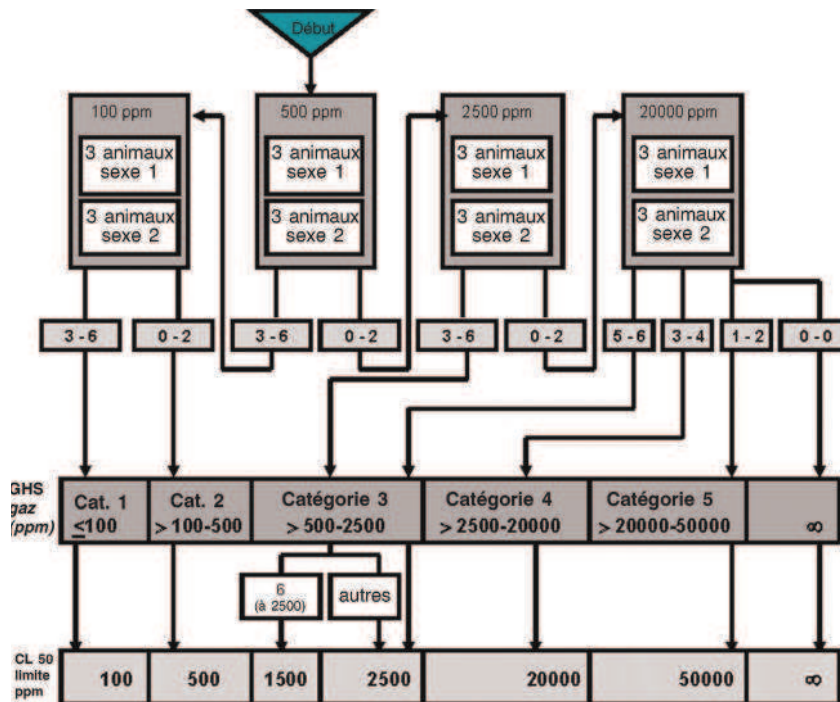
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4

Appendice 2 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 500 ppm/4h pour les gaz



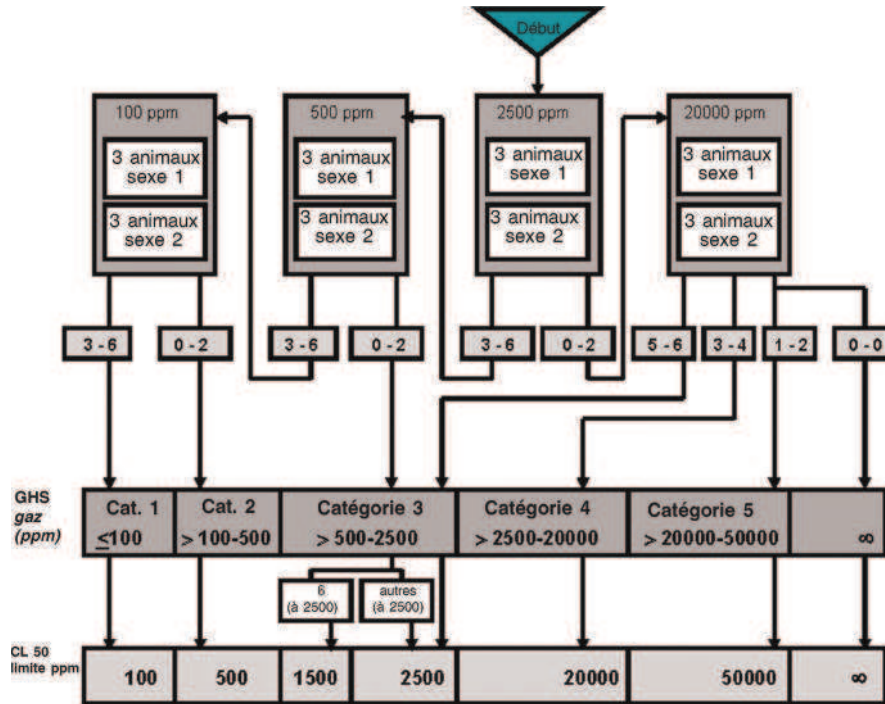
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4

Appendice 2 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 500 ppm/4h pour les gaz



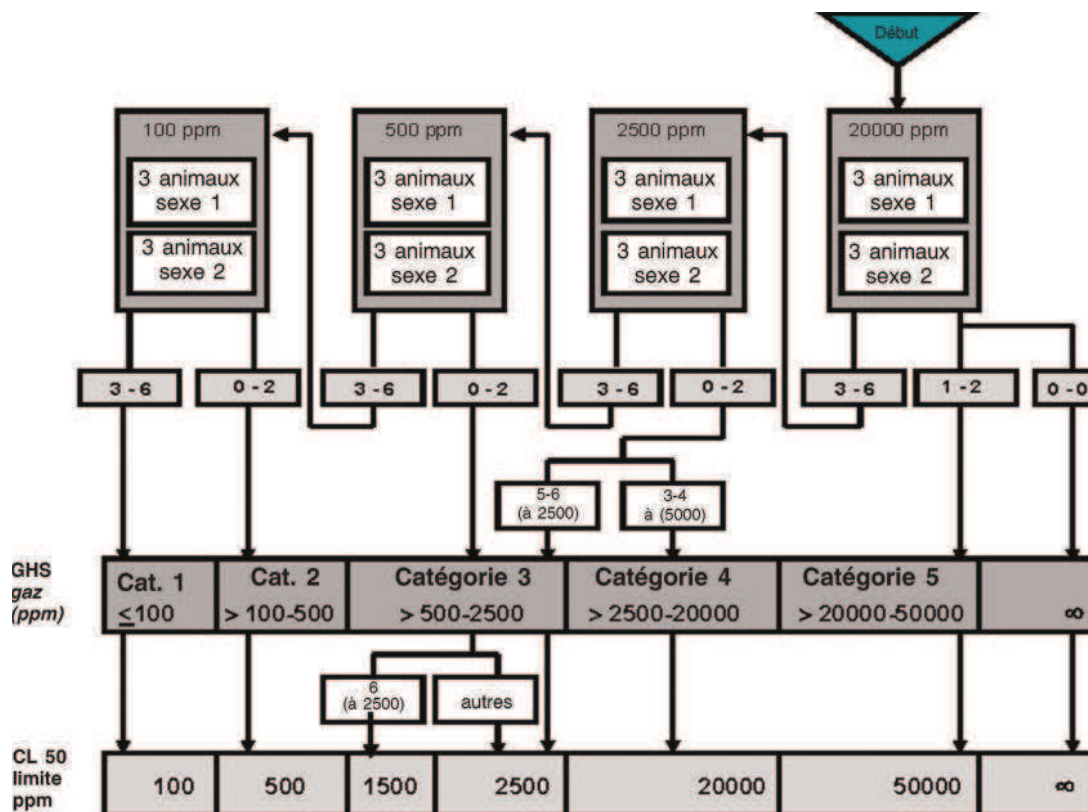
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4

Appendice 2 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 000 ppm/4h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à $\geq 20\ 000$ ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4*Appendice 3***Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des vapeurs (mg/l/4 h)**Remarques générales ⁽¹⁾

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 3 *bis*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 3 *ter*: concentration initiale de 2,0 mg/l.

Appendice 3 *quater*: concentration initiale de 10 mg/l.

Appendice 3 *quinquies*: concentration initiale de 20 mg/l.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

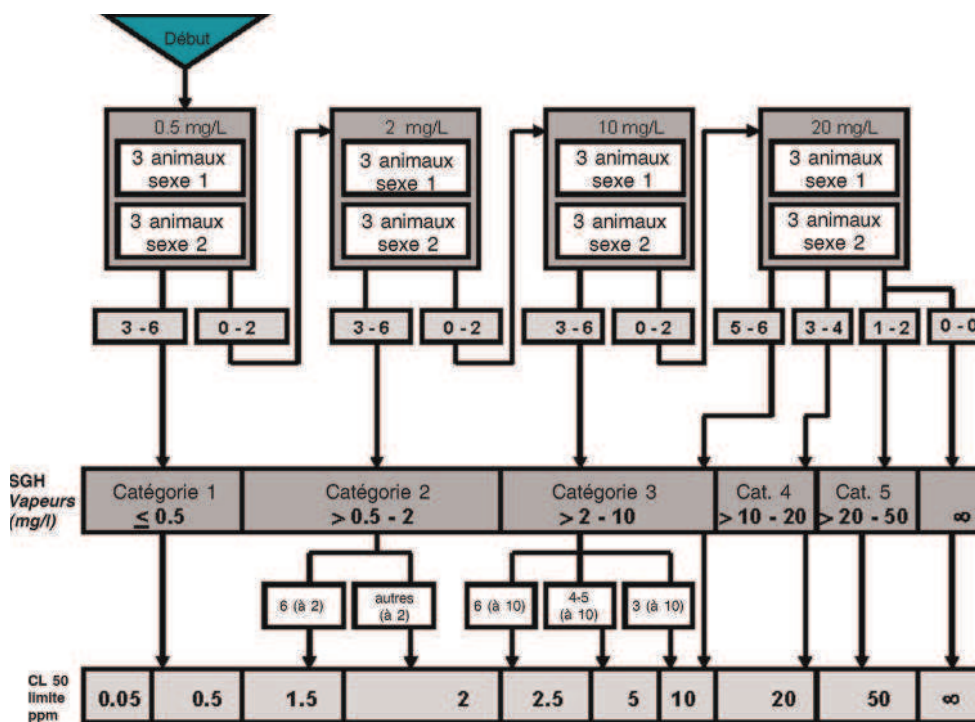
⁽¹⁾ Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼ M4

Appendice 3 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les vapeurs



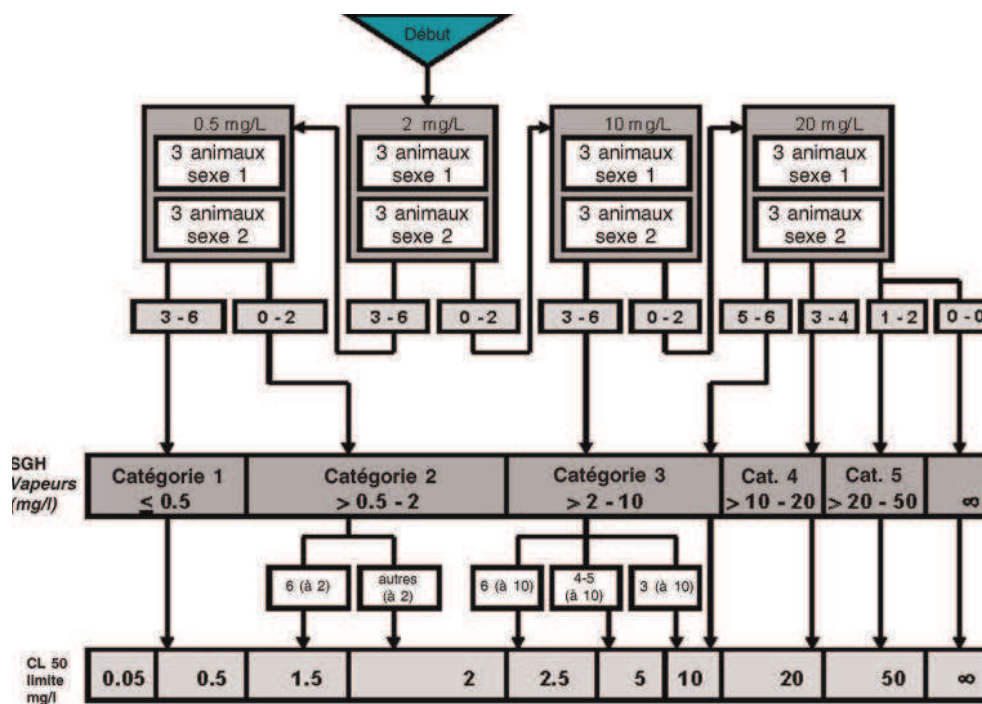
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ **M4**

Appendice 3 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 mg/l/4h pour les vapeurs



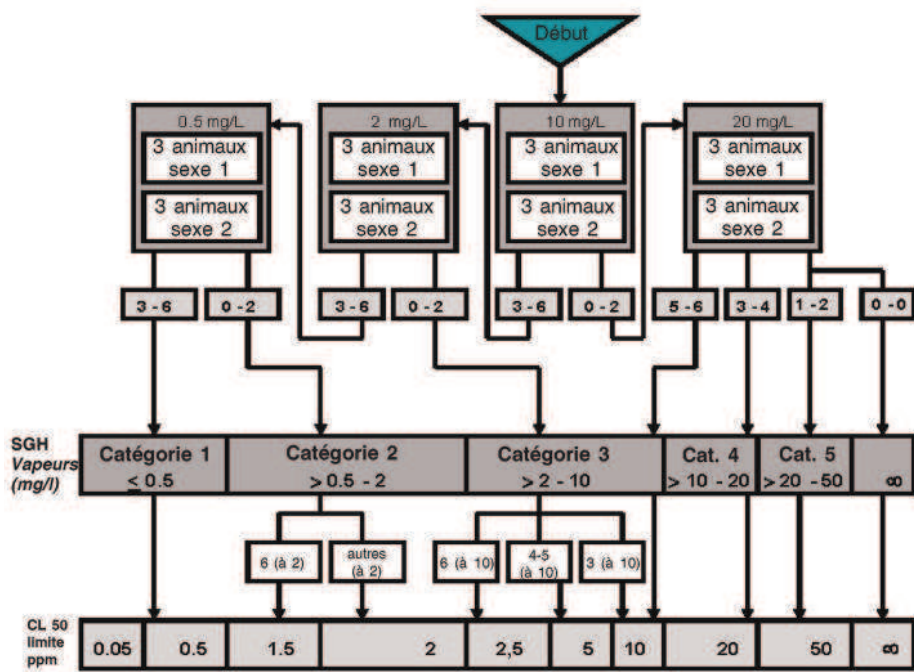
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4

Appendice 3 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 10 mg/l/4h pour les vapeurs



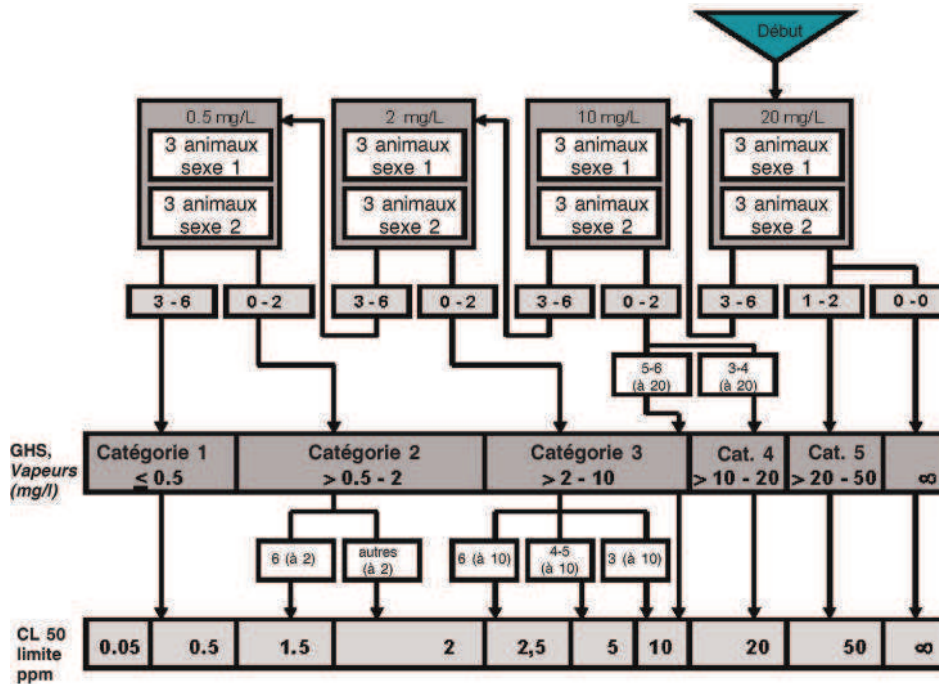
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ **M4**

Appendice 3 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 mg/l/4h pour les vapeurs



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4*Appendice 4***Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des aérosols (mg/l/4 h)**Remarques générales ⁽¹⁾

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 4 *bis*: concentration initiale de 0,05 mg/l.

Appendice 4 *ter*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 4 *quater*: concentration initiale de 1 mg/l.

Appendice 4 *quinquies*: concentration initiale de 5 mg/l.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

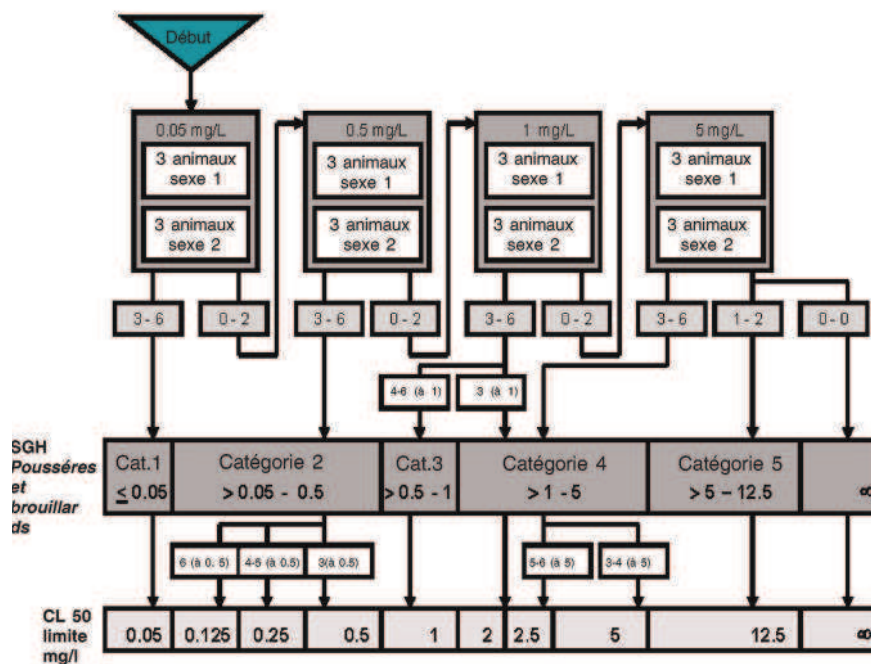
⁽¹⁾ Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼ M4

Appendice 4 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.05 mg/l/4h pour les vapeurs



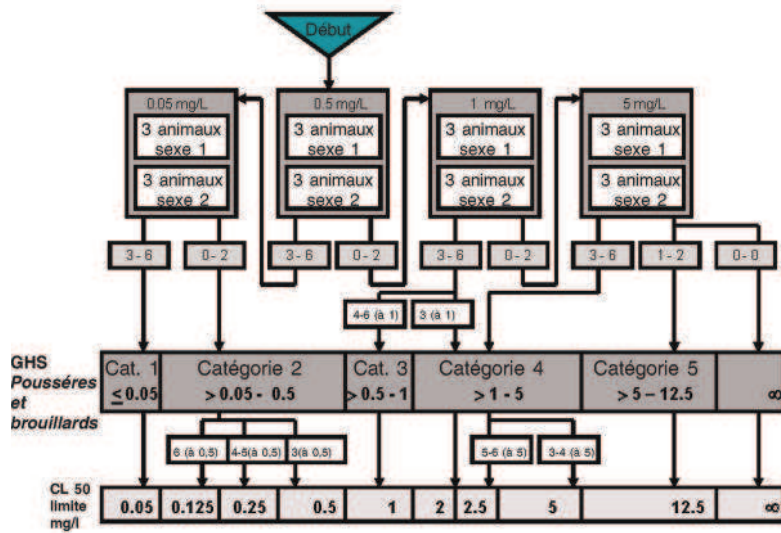
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4

Appendice 4 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les aérosols



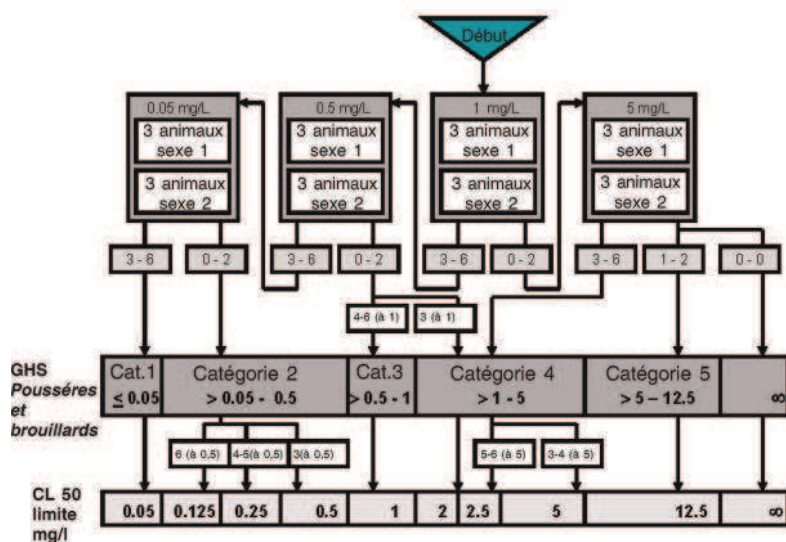
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ M4

Appendice 4 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

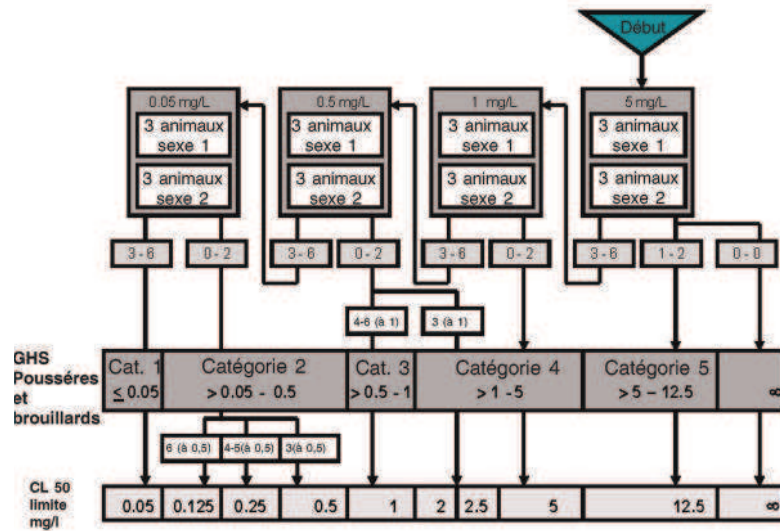
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 1 mg/l/4h pour les aérosols



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼ **M4***Appendice 4 quinquies***Toxicité aiguë par inhalation:**

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 5 mg/l/4h pour les aérosols



- $3\sigma + 3\varphi$, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)»

▼ **M5****B.53. ÉTUDE DE NEUROTOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 426 (2007) de l'OCDE. En juin 1995, à Copenhague, un groupe de travail de l'OCDE sur la toxicité pour la reproduction et le développement a débattu de la pertinence d'une actualisation des lignes directrices de l'OCDE existantes sur la toxicité pour la reproduction et le développement, et de l'élaboration de nouvelles lignes directrices sur des effets qui ne sont pas actuellement couverts (1). Le groupe de travail a recommandé la rédaction d'une ligne directrice concernant la neurotoxicité pour le développement, fondée sur une ligne directrice de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), révisée depuis (2). Une seconde réunion de consultation s'est tenue en juin 1996 à Copenhague avec pour objet de livrer au secrétariat des informations sur l'avant-projet d'une nouvelle ligne directrice sur la neurotoxicité pour le développement, notamment concernant des éléments majeurs tels que des précisions sur le choix de l'espèce animale, la période d'administration, la durée de l'essai, les effets à évaluer et les critères d'évaluation des résultats. L'US EPA a publié une ligne directrice sur l'évaluation des risques neurotoxiques en 1998 (3). Une consultation d'experts de l'OCDE et un atelier de travail de l'Institut des sciences du risque ISLI se sont tenus parallèlement en octobre 2000, tandis qu'une consultation d'experts a eu lieu à Tokyo en 2005. Ces rencontres avaient dans leur ensemble pour objectif de débattre de questions scientifiques et techniques relatives à l'actuelle ligne directrice, et les recommandations qui en ont résulté (4) (5) (6) (7) ont été prises en compte lors de l'élaboration de la présente méthode d'essai. Les documents d'orientation n° 43 'Reproductive Toxicity Testing and Assessment' (8) et n° 20 'Neurotoxicity testing' (9) contiennent d'autres informations sur la mise en œuvre, l'interprétation et la terminologie relatives à cette méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

2. De nombreuses substances chimiques sont connues pour entraîner des effets neurotoxiques sur le développement chez l'homme et chez d'autres espèces (10) (11) (12) (13). Il est parfois nécessaire de déterminer la neurotoxicité potentielle pour le développement d'une substance chimique et d'estimer et d'évaluer ses caractéristiques toxiques. Les études de neurotoxicité pour le développement ont pour objectif de produire des résultats relatifs aux effets fonctionnels et morphologiques potentiels exercés sur le système nerveux en développement de la progéniture après exposition in utero et aux premiers stades de la vie, notamment des caractérisations par des courbes de réponse à la dose.
3. Une étude de neurotoxicité pour le développement peut être menée isolément, ou intégrée dans une étude de toxicité pour la reproduction et/ou de neurotoxicité chez l'adulte [par exemple méthodes d'essai B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], ou encore annexée à une étude de toxicité pour le développement prénatal [par exemple méthode d'essai B.31 (17)]. Si l'étude est intégrée dans une autre étude ou annexée, il est impératif de maintenir l'intégrité des deux types d'études. Tous les essais doivent être conformes à la législation en vigueur et aux lignes directrices gouvernementales et institutionnelles applicables concernant l'utilisation des animaux de laboratoire à des fins de recherche (par exemple 18).
4. Le laboratoire qui mène l'essai doit tenir compte de toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'étude. Il s'agit notamment d'informations sur l'identité et la structure de la substance chimique, sur ses propriétés physico-chimiques, sur les résultats de tout autre essai de toxicité in vitro ou in vivo réalisé sur la substance, sur les données toxicologiques relatives à d'autres substances chimiques apparentées, ainsi que sur la ou les utilisations prévues de la substance. Ces renseignements sont nécessaires pour convaincre toutes les parties intéressées de l'intérêt de l'essai pour la protection de la santé humaine, et ils seront utiles pour déterminer la dose initiale appropriée.

▼ M5**PRINCIPE DE L'ESSAI**

5. La substance d'essai est administrée aux animaux pendant les périodes de gestation et de lactation. Les mères sont testées pour évaluer les effets sur les femelles gravides et allaitantes, avec pour objectif additionnel l'acquisition d'informations comparatives (entre mère et progéniture). La neurotoxicité est évaluée sur des descendants sélectionnés au hasard dans les portées. L'évaluation comprend des observations destinées à détecter des anomalies neurologiques macroscopiques et comportementales, notamment l'examen du développement physique, de l'ontogénie comportementale, de l'activité motrice, des fonctions motrices et sensorielles, et de l'apprentissage et de la mémoire, ainsi que l'évaluation pondérale du cerveau et de la neuropathologie au cours du développement postnatal et à l'âge adulte.

6. Lorsque la méthode d'essai est mise en œuvre dans le cadre d'une étude séparée, il est possible d'appliquer sur des animaux surnuméraires disponibles dans chaque groupe des protocoles spécifiques d'étude du neurocomportement, de neuropathologie, de neurochimie ou d'électrophysiologie susceptibles de compléter les résultats obtenus par les examens recommandés par la présente méthode d'essai (16) (19) (20) (21). Ces protocoles présentent un intérêt particulier lorsque l'observation empirique, les effets escomptés ou le mécanisme ou le mode d'action évoquent un type spécifique de neurotoxicité. Ces protocoles supplémentaires peuvent être appliqués aux mères aussi bien qu'aux petits. Il est également possible de recourir à d'autres protocoles ex vivo ou in vitro, sous réserve qu'ils n'altèrent pas l'intégrité des protocoles in vivo.

PRÉPARATIONS EN VUE DE L'ESSAI**Sélection de l'espèce animale**

7. L'espèce animale expérimentale privilégiée est le rat; d'autres espèces peuvent être utilisées, s'il y a lieu. Toutefois, il convient de noter que le nombre de jours de gestation et de développement postnatal spécifiés dans cette méthode d'essai correspond à des souches de rats couramment utilisées, et que des durées comparables devront être choisies dans le cas de l'utilisation d'une autre espèce ou d'une souche inhabituelle. L'emploi d'une autre espèce sera justifié par des données toxicologiques, pharmacocinétiques, et/ou d'une autre nature. La légitimation du choix doit s'appuyer sur des évaluations neurocomportementales et neuropathologiques postnatales déjà disponibles, spécifiques de l'espèce. Lorsqu'un essai antérieur a produit des résultats préoccupants, il convient de se pencher sur l'espèce ou la souche utilisée pour cet essai. Les différentes souches de rat se caractérisent par des performances dissemblables et il convient donc de fournir les preuves démontrant que la souche sélectionnée présente une fécondité et une réactivité adéquates. La fiabilité et la sensibilité de la détection de la neurotoxicité pour le développement sur les autres espèces devront être documentées.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. La température du local abritant les animaux expérimentaux doit être de 22 ± 3 °C. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et, de préférence, elle n'excédera pas 70 %, sauf pendant le nettoyage du local, mais il faut s'efforcer de la maintenir à 50-60 %. L'éclairage doit être artificiel, avec une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Il est possible d'inverser le cycle d'éclairage avant l'accouplement et pendant la durée de l'étude, afin de procéder aux évaluations des effets fonctionnels et comportementaux pendant la période d'obscurité (sous lumière rouge), c'est-à-dire pendant la période d'activité normale des animaux (22). Toute modification du cycle lumière-obscurité doit inclure une période d'acclimatation suffisante pour l'adaptation des animaux aux nouvelles conditions. L'alimentation correspond à des régimes de laboratoire conventionnels avec accès illimité à l'eau de boisson. Il y a lieu de consigner la nature des aliments et de l'eau et d'analyser ceux-ci pour détecter la présence de contaminants.

▼ M5

9. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages adaptées à cet usage. Dès confirmation de la copulation ou avant le 15^e jour de gestation, les animaux fécondés doivent être placés individuellement dans des cages de mise bas ou de maternité. Cet équipement doit être aménagé pour réduire au minimum les éventuels effets de placement en cage. Les femelles fécondées disposeront de matériaux de nidification adéquats et bien définis aux abords de la mise bas. Il est notoire qu'une manipulation ou un stress superflu pendant la gestation peut provoquer des effets indésirables, notamment un avortement ou un développement fœtal ou postnatal perturbé. Afin de se prémunir contre une mortalité fœtale due à des facteurs non liés au traitement, il convient de manipuler avec soin les animaux pendant la gestation, et d'éviter tout stress exercé par des facteurs externes tels qu'un bruit excessif.

Préparation des animaux

10. Il faut utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire et n'ayant préalablement subi aucun traitement expérimental, à moins que l'étude ne soit incorporée dans une autre étude (voir paragraphe 3). Les animaux expérimentaux doivent être caractérisés en termes d'espèce, de souche, de source, de sexe, de poids et d'âge. Chaque animal doit être affecté et marqué d'un numéro d'identification individuel. Il convient de maintenir autant que possible une uniformité de poids et d'âge des animaux, dans tous les groupes de l'essai, et de se trouver dans la gamme de valeurs normales de l'espèce et de la souche étudiées. À chaque niveau de dose, il faut utiliser des animaux femelles nullipares adultes jeunes. Les individus d'une même fratrie ne peuvent pas être accouplés, et des précautions doivent être prises dans ce sens. Le jour de gestation (JG) 0 est le jour auquel on observe un bouchon vaginal et/ou des spermatozoïdes. Les animaux à gestation datée acquis auprès d'un fournisseur disposeront d'une période d'acclimatation adéquate (par exemple 2-3 jours). Les femelles fécondées doivent être affectées sans biais aux groupes témoin et de traitement et, dès que possible, uniformément réparties dans les groupes (par exemple il est recommandé d'employer un protocole aléatoire stratifié pour uniformiser la répartition entre tous les groupes, notamment fondé sur le poids corporel). Les femelles inséminées par le même mâle doivent être également réparties dans les groupes.

PROTOCOLE**Nombre et sexe des animaux**

11. Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre suffisant de femelles gravides exposées à la substance d'essai afin de garantir l'obtention d'un nombre adéquat de descendants pour évaluer la neurotoxicité. Un nombre total de 20 portées est recommandé pour chaque niveau de dose. Il est possible d'utiliser des modèles d'administration avec répétition des expériences et groupes échelonnés sous réserve que le nombre total de portées par groupe soit adéquat, et que des modèles statistiques appropriés soient utilisés pour tenir compte des expériences identiques.
12. Au jour 4 après la naissance (JAN 4) ou avant (le jour de la mise bas est JAN 0), la taille de chaque portée doit être ajustée en éliminant les petits en excès par sélection aléatoire pour que toutes les portées soient de taille identique (23). La taille de la portée ne doit pas dépasser la taille de portée moyenne pour la souche de rongeur utilisée (8-12). Les nombres de petits mâles et femelles doivent être aussi proches que possible de l'égalité. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits basée, par exemple, sur le poids corporel. Après standardisation des portées (restriction) et avant toute analyse des effets fonctionnels, chaque petit sur lequel on a programmé des essais présevrage ou postsevrage doit être identifié individuellement par une méthode humaine adéquate d'identification des petits (par exemple 24).

▼ **M5****Affectation des animaux aux essais fonctionnels et comportementaux, aux mesures de poids du cerveau et aux évaluations neuropathologiques**

13. La méthode d'essai admet des approches diverses quant à la répartition des animaux exposés in utero et via l'allaitement dans les différents essais fonctionnels et comportementaux, à la détermination de la maturité sexuelle et du poids du cerveau et à l'évaluation neuropathologique (25). Il est possible d'ajouter d'autres essais sur la fonction neurocomportementale (par exemple comportement social), ou des essais de neurochimie ou de neuropathologie, au cas par cas, à condition que l'intégrité des essais initiaux requis ne soit pas compromise.
14. Les petits sont sélectionnés dans chaque groupe de dose et affectés à une évaluation d'effet au JAN 4 ou après. La sélection des petits doit permettre, dans la mesure du possible, une représentation équilibrée des deux sexes de chaque portée, pour chaque groupe de dose, dans tous les essais. Dans le test d'activité motrice, il convient d'analyser la même paire de petits mâle et femelle à tous les âges de présevrage (voir paragraphe 35). Pour tous les autres essais, on peut affecter des paires identiques ou différentes d'animaux mâles et femelles aux différents essais comportementaux. Pour l'étude de la fonction cognitive, il peut s'avérer nécessaire d'affecter des petits différents aux essais sur animaux immatures et sur animaux adultes, afin d'éviter toute confusion entre les effets de l'âge et les effets d'un entraînement antérieur pour ces mesures (26) (27). Au moment du sevrage (JAN 21), les petits qui ne sont pas sélectionnés pour des tests peuvent être sacrifiés humainement. Toute modification de la répartition des petits doit être consignée. L'unité statistique de la mesure est la portée (ou la mère) et non le petit.
15. Il existe différentes façons de répartir les petits dans les examens présevrage et postsevrage, les essais cognitifs, les examens pathologiques, etc. (un modèle général est proposé à la figure 1 et des exemples de répartition sont présentés dans l'appendice 1). Il est recommandé d'employer les nombres minimaux suivants d'animaux dans chaque groupe de dose pour les examens présevrage et postsevrage:

Observations cliniques et poids corporel	Tous les animaux
Observations cliniques détaillées	20/sexe (1/sexe/portée)
Poids du cerveau (postfixation) JAN 11-22	10/sexe (1/portée)
Poids du cerveau (non fixé) ~JAN 70	10/sexe (1/portée)
Neuropathologie (fixation par immersion ou perfusion) JAN 11-22	10/sexe (1/portée)
Neuropathologie (fixation par perfusion) JAN ~70	10/sexe (1/portée)
Maturité sexuelle	20/sexe (1/sexe/portée)
Autres marqueurs du développement (facultatif)	Tous les animaux
Ontogénie comportementale	20/sexe (1/sexe/portée)
Activité motrice	20/sexe (1/sexe/portée)
Fonction motrice et sensorielle	20/sexe (1/sexe/portée)
Apprentissage et mémoire	10/sexe ^(a) (1/portée)

^(a) Selon la sensibilité des essais de fonction cognitive, il faut parfois envisager d'étudier un plus grand nombre d'animaux, par exemple 1 mâle et 1 femelle par portée (pour la répartition des animaux, se reporter à l'appendice 1) [d'autres recommandations sur la taille de l'échantillon sont fournies dans le document d'orientation no 43 de l'OCDE (8)].

▼ **M5****Dosage**

16. On doit utiliser au moins trois niveaux de doses différents et un groupe témoin en parallèle. Les niveaux de dose doivent être espacés de façon à produire une gradation des effets toxiques. Si elle n'est pas limitée par les propriétés physico-chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit être choisie en vue d'induire une certaine toxicité pour la mère [par exemple signes cliniques, diminution du gain de poids corporel (pas plus de 10 %) et/ou preuve de toxicité limitée par la dose dans un organe cible]. La dose élevée ne doit pas dépasser 1 000 mg/kg/jour de poids corporel, sauf exception, par exemple, si l'exposition humaine prévue indique qu'il est nécessaire d'utiliser une dose plus élevée. Il est également possible de mener des études pilotes ou des études préliminaires de détermination d'un ordre de grandeur afin de définir la dose la plus élevée qu'il faut utiliser pour produire une toxicité minimale pour la mère. Lorsque la substance d'essai s'est révélée toxique sur le plan du développement dans une étude standard de toxicité pour le développement ou dans une étude pilote, la dose la plus élevée doit être la dose maximale qui n'induit pas de toxicité excessive pour la descendance, ni de mort in utero ou néonatale, ni de malformations, qui empêcherait une évaluation significative de la neurotoxicité. La dose la plus faible ne doit produire aucun signe de toxicité pour la mère ni de toxicité pour le développement, notamment de neurotoxicité. Il convient de sélectionner une séquence de doses décroissantes en vue de mettre en évidence une relation dose-effet et une concentration sans effet nocif observé (CSENO), ou des doses proches de la limite de détection permettant de déterminer un niveau de référence. Les intervalles optimaux au sein d'une séquence de doses décroissantes sont souvent d'un facteur de 2 à 4 et l'adjonction d'un quatrième groupe de dose est souvent préférable à l'administration de doses très espacées (par exemple par un facteur de plus de 10).

17. Il convient de choisir des niveaux de dose en considérant toutes les données existantes sur la toxicité ainsi que d'autres informations sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de composés apparentés. Ces informations contribueront également à justifier l'échelle des doses. Il faut envisager l'administration directe aux petits en se fondant sur des informations relatives à l'exposition et à la pharmacocinétique (28) (29). Il faudra soigneusement évaluer les avantages et les inconvénients avant la mise en œuvre d'études d'administration directe (30).

18. Le groupe témoin étudié en parallèle doit être un groupe témoin fictivement traité ou un groupe témoin traité par le véhicule, lorsqu'un véhicule est utilisé pour administrer la substance d'essai. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule, rapporté au poids corporel. Lorsqu'un véhicule ou un autre adjuvant est utilisé pour faciliter l'administration, il convient de tenir compte des caractéristiques suivantes: effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme, ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier ses caractéristiques toxiques; effets sur la consommation d'aliments ou d'eau ou l'état nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit provoquer aucun effet susceptible d'interférer avec l'interprétation de l'étude et ne doit induire aucune toxicité sur le plan neurocomportemental, ni exercer d'effets sur la reproduction ou le développement. Dans le cas de l'utilisation de nouveaux véhicules, il convient d'inclure dans l'étude, outre le groupe véhicule témoin, un groupe témoin fictivement traité. Les animaux inclus dans le ou les groupes témoins doivent être manipulés exactement comme les animaux des groupes d'essai.

▼ M5**Administration des doses**

19. La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés par la voie la plus représentative de l'exposition humaine potentielle, en fondant le choix sur des informations disponibles sur le métabolisme et la distribution dans les animaux expérimentaux. La voie d'administration sera généralement orale (par exemple gavage, aliments ou eau de boisson), mais il est possible d'utiliser d'autres voies (par exemple voie cutanée, inhalation), justifiées par des caractéristiques particulières ou des voies d'exposition de l'homme envisagées ou connues [d'autres informations sont fournies dans le document d'orientation n° 43 (8)]. Il convient de motiver le choix de la voie d'administration. La substance d'essai doit être administrée tous les jours à peu près au même moment.
20. La dose administrée à chaque animal dépend normalement de la mesure la plus récente du poids corporel du sujet. Toutefois, les doses devront être ajustées avec précaution dans le dernier tiers de la gestation. Si une toxicité excessive est observée sur les mères traitées, elles seront humainement sacrifiées.
21. La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés au minimum quotidiennement aux femelles fécondées à partir du moment de l'implantation (JG 6) et jusqu'à la fin de la lactation (JAN 21), de façon à exposer les petits à la substance d'essai pendant le développement neurologique prénatal et postnatal. L'âge au début de l'administration et la durée et la fréquence des administrations peuvent être ajustés, s'il est démontré qu'un autre modèle expérimental correspond mieux aux expositions de l'homme. Les durées d'administration doivent être adaptées aux autres espèces de façon à garantir une exposition pendant toutes les périodes précoces du développement du cerveau (c'est-à-dire équivalentes à la croissance cérébrale humaine prénatale et postnatale précoce). Il est possible de commencer l'administration au début de la gestation (JG 0), mais il convient d'envisager que la substance d'essai puisse entraîner une perte préimplantatoire. Le choix d'une administration à partir du JG 6 permettrait d'écartier ce risque, mais les stades du développement compris entre JG 0 et 6 ne seraient alors pas traités. Il est possible de commencer l'administration à JG 0 sur des animaux à accouplement daté acquis par le laboratoire, et JG 6 semble par conséquent un bon compromis de jour de départ. Le laboratoire d'essai prendra soin d'ajuster le régime posologique conformément aux informations pertinentes dont il dispose sur les effets de la substance d'essai, avant l'expérience, et conformément à des considérations logistiques, notamment par le prolongement de l'administration après le sevrage. Il est préférable d'interrompre l'administration le jour de la parturition chez les animaux qui n'ont pas mis bas tous leurs descendants. On estime en général que les petits sont exposés par l'intermédiaire du lait maternel; toutefois, l'administration directe aux petits doit être envisagée dans les cas d'absence de preuve d'une exposition continue de la progéniture. Ces preuves peuvent être tirées, par exemple, d'informations pharmacocinétiques, de toxicité sur la progéniture ou de modification des marqueurs biologiques (28).

OBSERVATIONS**Observations sur les mères**

22. Toutes les mères doivent faire l'objet d'une observation attentive au moins une fois par jour, afin de constater leur état de santé et de relever la morbidité et la mortalité.
23. Pendant les périodes de traitement et d'observation, des examens cliniques plus détaillés sont périodiquement menés (au moins deux fois pendant la période d'administration au cours de la gestation et deux fois pendant la période d'administration au cours de la lactation), en employant au moins dix mères par dose. Les animaux doivent être observés à l'extérieur de leur cage d'habitation, par des techniciens formés ignorant le traitement des animaux, et suivant des protocoles normalisés visant à limiter autant que possible les biais liés au stress des animaux, à l'observateur, et à optimiser la reproductibilité interobservateurs. Dans la mesure du possible, il est préférable que toutes les observations d'une étude donnée soient réalisées par le même technicien.

▼ **M5**

24. La présence de signes observés doit être consignée. Autant que possible, leur ampleur doit également être notée. Les observations cliniques incluront, sans s'y limiter, des modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, la présence de sécrétions, et l'activité autonome (par exemple larmolement, horripilation, taille des pupilles, mode de respiration inhabituel, et/ou respiration par la bouche, et tous signes inhabituels de miction ou défécation).
25. Il faut également noter toutes les réactions inhabituelles dans la position du corps, le niveau d'activité (par exemple augmentation ou diminution de l'exploration de la zone standard) et la coordination des mouvements. Les modifications de la marche (par exemple marche en canard, ataxie), de la posture (par exemple dos rond) et de la réactivité à la manipulation, à la pose ou à d'autres stimuli environnementaux, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de convulsions, de tremblements, de stéréotypies (par exemple toilettage excessif, mouvements inhabituels de la tête, déplacements répétés en cercle), de comportements étranges (par exemple morsures ou léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation), ou d'agression doivent être enregistrés.
26. Les signes de toxicité doivent être enregistrés, notamment le jour de leur apparition, le moment de la journée, leur degré et leur durée.
27. Les animaux sont pesés au moment de l'administration au moins une fois par semaine pendant toute l'étude, ou le jour de la mise bas ou à un moment proche de ce jour et à JAN 21 (sevrage). Dans les études par gavage, les mères doivent être pesées au moins deux fois par semaine. Les doses sont ajustées au moment de chaque pesée, s'il y a lieu. La consommation d'aliments est mesurée une fois par semaine au moins pendant la gestation et la lactation. La consommation d'eau doit être mesurée au moins une fois par semaine si les animaux sont exposés par l'eau de boisson.

Observations sur la progéniture

28. Tous les petits doivent être attentivement examinés au moins quotidiennement pour détecter les signes de toxicité et déterminer la morbidité et la mortalité.
29. Pendant les périodes de traitement et d'observation, des examens cliniques plus détaillés des descendants doivent être réalisés. La progéniture (au moins un petit/sexe/portée) doit être observée par des techniciens formés ignorant le traitement des animaux, suivant des protocoles normalisés visant à réduire au minimum les biais et à optimiser la reproductibilité interobservateurs. Dans la mesure du possible, il est préférable que les observations soient réalisées par le même technicien. On contrôlera au minimum les effets décrits dans les paragraphes 24 et 25, s'ils s'appliquent au stade du développement étudié.
30. Tous les signes de toxicité sur la progéniture doivent être consignés, notamment le jour de leur apparition, le moment de la journée, leur degré et leur durée.

Marqueurs physiques et développementaux

31. Les modifications des marqueurs du développement antérieurs au sevrage (par exemple dépliement du pavillon de l'oreille, ouverture des yeux, poussée des incisives) sont étroitement corrélées au poids corporel (30) (31). Le poids corporel est donc souvent le meilleur indicateur du développement physique. Il est par conséquent recommandé de mesurer les marqueurs de développement uniquement lorsque les indices préalables suggèrent que ces données fourniront de nouvelles informations. Le calendrier d'évaluation de ces paramètres est indiqué dans le tableau 1. En se fondant sur les effets anticipés et les résultats des mesures initiales, il peut être judicieux d'ajouter d'autres dates d'examen ou de réaliser les mesures à d'autres stades du développement.

▼ **M5**

32. Il est préférable d'utiliser l'âge postcoïtal plutôt que l'âge postnatal pour évaluer le développement physique (33). Si l'essai est réalisé le jour du sevrage, il est recommandé d'examiner les petits avant sevrage effectif pour éviter toute confusion avec l'effet du stress associé au sevrage. De surcroît, on ne procédera à aucun examen postsevrage des petits au cours des deux jours qui suivent cet événement.

Tableau 1

Calendrier d'évaluation des marqueurs physiques et développementaux, et des effets fonctionnels/comportementaux ^(a)

Effets \ Âges	Présevrage ^(b)	Adolescence ^(b)	Jeunes adultes ^(b)
Marqueurs physiques et développementaux			
Poids corporel et observations cliniques	hebdomadaire ^(c)	au moins toutes les deux semaines	au moins toutes les deux semaines
Poids du cerveau	JAN 22 ^(d)		à la fin
Neuropathologie	JAN 22 ^(d)		à la fin
Maturité sexuelle	—	en temps opportun	—
Autres marqueurs du développement ^(e)	s'il y a lieu	—	—
Effets fonctionnels/comportementaux			
Ontogénie comportementale	au moins deux mesures		
Activité motrice (y compris accoutumance)	1-3 fois ^(f)	—	une fois
Fonction motrice et sensorielle	—	une fois	une fois
Apprentissage et mémoire	—	une fois	une fois

^(a) Ce tableau présente le nombre minimal de mesures à réaliser. En fonction des effets anticipés et des résultats des mesures initiales, il peut être judicieux d'ajouter d'autres dates d'examen (par exemple sur animaux âgés) ou de réaliser les mesures à d'autres stades du développement.

^(b) Il est recommandé de suspendre l'essai sur les petits pendant les deux jours qui suivent le sevrage (voir paragraphe 32). Les dates suivantes sont conseillées pour les essais sur adolescents: apprentissage et mémoire = JAN 25 ± 2; fonction motrice et sensorielle = JAN 25 ± 2. Les âges recommandés pour les essais sur jeunes adultes sont JAN 60-70.

^(c) Il convient de mesurer les masses corporelles au moins deux fois par semaine dans le cas d'une administration directe sur les petits afin d'ajuster les doses pendant la période de gain de masse corporelle rapide.

^(d) Le poids du cerveau et la neuropathologie peuvent être évalués plus tôt (par exemple JAN 11), si nécessaire (voir paragraphe 39).

^(e) Le cas échéant, d'autres marqueurs du développement, outre le poids corporel (par exemple ouverture des yeux), seront consignés (voir paragraphe 31).

^(f) Voir paragraphe 35.

33. Les petits vivants doivent être comptés et sexés, par exemple, par examen visuel ou mesure de la distance ano-génitale (34) (35), et chaque petit d'une portée doit être pesé individuellement à la naissance ou peu après, puis au moins une fois par semaine pendant l'allaitement, et au moins toutes les deux semaines par la suite. Pour évaluer la maturité sexuelle, il faut déterminer l'âge et la masse corporelle de l'animal à l'apparition de la perméabilité vaginale (36) ou de la séparation prépucciale (37) sur au moins un mâle et une femelle par portée.

▼ **M5****Ontogénie comportementale**

34. L'ontogénie des comportements sélectionnés doit être mesurée sur au moins un petit/sexe/portée pendant la période d'âge appropriée, et sur les mêmes petits à toutes les dates d'essai pour tous les comportements évalués. Il convient d'espacer uniformément les dates de mesure sur cette période, afin de déterminer si la modification de l'ontogénie de ce comportement est normale ou liée au traitement (38). Quelques exemples de comportements susceptibles de donner lieu à une évaluation de l'ontogénie sont les suivants: réflexe de redressement, géotaxie négative et activité motrice (38) (39) (40).

Activité motrice

35. L'activité motrice doit être suivie (41) (42) (43) (44) (45) pendant la période préalable au sevrage et à l'âge adulte. La mise en œuvre de l'essai au moment du sevrage est décrite au paragraphe 32. La longueur de la session d'essai doit permettre de démontrer l'accoutumance intrasession des témoins non traités. Il est vivement recommandé d'utiliser l'activité motrice pour évaluer l'ontogénie comportementale. Dans un essai d'ontogénie comportementale, il faut utiliser les mêmes animaux dans toutes les sessions d'essai préalables au sevrage. Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour permettre d'évaluer l'ontogénie de l'accoutumance intrasession (44). À cet effet, l'essai peut demander trois examens ou davantage avant le sevrage, jour du sevrage compris (par exemple JAN 13, 17, 21). Il convient également d'analyser les mêmes animaux, ou des animaux de la fratrie, à l'âge adulte vers la fin de l'étude (par exemple à JAN 60-70). Si nécessaire, des dates d'essai peuvent être ajoutées. L'activité motrice doit être contrôlée par un appareil d'enregistrement automatique capable de détecter aussi bien des augmentations que des diminutions d'activité (c'est-à-dire que l'activité de base mesurée par le dispositif ne doit pas être trop modérée, ce qui empêcherait la détection des diminutions d'activité, ni trop élevée, ce qui empêcherait la détection d'augmentations). Tous les appareils seront testés par des protocoles standard afin de garantir, dans la mesure du possible, la reproductibilité entre appareils et entre dates de mesure. Il conviendra d'équilibrer au mieux les groupes de traitement affectés à chaque appareil. Chaque animal doit être testé individuellement. Il faut répartir les groupes d'évaluation de l'essai sur la journée pour tenir compte des rythmes d'activité circadiens. On s'attachera particulièrement à réduire au minimum les variations affectant les conditions de l'essai et à éviter de les rattacher systématiquement au traitement. Les variables susceptibles d'affecter de nombreuses mesures du comportement, notamment l'activité motrice, comprennent l'intensité du bruit, les dimensions et la forme de la cage de l'essai, la température, l'humidité relative, les conditions de luminosité, les odeurs, l'utilisation de la cage d'habitation pour les tests ou d'une nouvelle cage d'essai et les distractions dues à l'environnement.

Fonction motrice et sensorielle

36. Les fonctions motrices et sensorielles doivent être étudiées en détail au moins une fois pendant la période de l'adolescence et une fois à l'âge jeune adulte (par exemple JAN 60-70). Pour procéder aux essais au moment du sevrage, se reporter au paragraphe 32. Il convient de mener les expériences en nombre suffisant pour garantir un échantillonnage quantitatif approprié des modalités sensorielles (par exemple somato-sensorielle, vestibulaire) et des fonctions motrices (par exemple force, coordination). La réponse à la poussée (46), le réflexe de redressement (47) (48), l'accoutumance au sursaut auditif (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54), et les potentiels évoqués (55) comptent parmi les exemples de tests des fonctions motrices et sensorielles.

▼ **M5****Essais d'apprentissage et de mémoire**

37. Un essai d'apprentissage associatif et de mémoire doit être mené après le sevrage (par exemple 25 ± 2 jours) et chez les jeunes adultes (JAN 60 et plus). Pour ce qui est de l'essai au moment du sevrage, on se reportera au paragraphe 32. Il est possible d'utiliser des essais identiques ou différents aux deux stades de développement. Le choix du ou des essais d'apprentissage et de mémoire chez les rats sevrés et adultes reste relativement libre, mais les tests doivent satisfaire deux critères. Tout d'abord, l'apprentissage doit être évalué soit comme un changement au cours de plusieurs tests ou sessions répétées d'apprentissage, ou bien, dans des essais mettant en œuvre un seul test, par référence à une condition expérimentale qui contrôle les effets non associatifs de l'entraînement. De plus, le ou les essais doivent inclure une mesure de la mémoire (à court terme ou à long terme) en plus de l'apprentissage initial (acquisition), mais cette mesure de mémoire n'a pas lieu d'être rapportée si une mesure d'acquisition n'a pas été obtenue dans le même essai. Dans le cas où le ou les essais d'apprentissage et de mémoire démontrent un effet de la substance d'essai, il convient d'envisager l'utilisation d'autres tests visant à éliminer toute interprétation fondée sur des altérations des capacités sensorielles, de motivation et/ou motrices. Outre ces deux critères, il est recommandé de choisir l'essai d'apprentissage et de mémoire en tenant compte de sa sensibilité démontrée à la classe de la substance chimique à l'étude, dans la mesure où cette information est disponible dans la littérature. Si elle ne l'est pas, la liste ci-dessous propose des tests qui peuvent être réalisés pour satisfaire aux critères mentionnés plus haut dans ce paragraphe: test d'évitement passif (43) (56) (57), appariement retardé de la position pour le rat adulte (58) et pour le rat avant sevrage (59), conditionnement olfactif (43) (60), labyrinthe d'eau de Morris (61) (62) (63), labyrinthe de Biel ou de Cincinnati (64) (65), labyrinthe à bras radiaux (66), labyrinthe en T (43), acquisition et rétention d'un comportement programmé (26) (67) (68). D'autres essais décrits dans la littérature s'appliquent aux rats sevrés (26) (27) et adultes (19) (20).

Autopsie

38. Les mères peuvent être euthanasiées après sevrage de leur progéniture.
39. L'évaluation neuropathologique des descendants sera menée sur des tissus prélevés sur des animaux humainement sacrifiés au JAN 22 ou plus tôt dans l'étude, entre JAN 11 et JAN 22, et également à la fin de l'étude. Les tissus cérébraux doivent être examinés sur les petits sacrifiés jusqu'au JAN 22; sur les animaux sacrifiés à la fin de l'étude, on évaluera les tissus du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP). Les tissus des animaux sacrifiés au JAN 22 ou plus tôt peuvent être fixés par immersion ou perfusion. Ceux des animaux tués à la fin de l'étude doivent être fixés par perfusion. Tous les aspects de la préparation des échantillons de tissus, depuis la perfusion des animaux jusqu'à la dissection des échantillons de tissus, au traitement des tissus et à la coloration des lames, devront respecter un plan expérimental contrebalancé tel que chaque lot contienne des échantillons représentatifs de chaque groupe de dose. Le document d'orientation n° 20 de l'OCDE (9) contient des informations supplémentaires sur la neuropathologie [voir également (103)].

Traitement des échantillons de tissus

40. Toutes les anomalies macroscopiques évidentes au moment de l'autopsie doivent être consignées. Les échantillons de tissus prélevés doivent représenter les principales régions du système nerveux. Les échantillons sont conservés dans un fixateur approprié et traités en suivant des protocoles histologiques publiés normalisés (69) (70) (71) (103). L'inclusion dans la paraffine est acceptée pour les tissus du SNC et du SNP, mais l'utilisation d'osmium lors de la postfixation, associée à des inclusions dans une résine époxy, convient parfois mieux lorsqu'un degré plus élevé de résolution est

▼ **M5**

requis (par exemple pour les nerfs périphériques, en cas de suspicion d'une neuropathie périphérique ou pour une analyse morphométrique des nerfs périphériques). Les tissus cérébraux prélevés à des fins d'analyse morphométrique doivent être inclus dans un milieu approprié, simultanément pour toutes les doses, afin d'éviter les artefacts de rétrécissement parfois associés à un stockage prolongé dans le fixateur (6).

Examen neuropathologique

41. L'examen qualitatif a les objectifs suivants:

- i) repérer les régions du système nerveux présentant des indices d'altérations neuropathologiques;
- ii) recenser les types d'altérations neuropathologiques provoqués par l'exposition à la substance d'essai, et
- iii) évaluer la gravité des altérations neuropathologiques.

Des coupes histologiques représentatives des échantillons de tissus doivent être examinées au microscope par un pathologiste de formation adéquate afin de détecter des altérations neuropathologiques. Toutes les altérations détectées seront caractérisées par un degré de gravité subjectif. Une coloration hématoxyline et éosine suffisent souvent pour évaluer les coupes de cerveau des animaux humainement sacrifiés à JAN 22 ou plus tôt. Toutefois, une coloration de la myéline (par exemple fast blue luxol/violet de crésyl) et une coloration à l'argent (par exemple colorations de Bielschowsky ou de Bodians) sont recommandées pour les coupes de tissus du SNC et du SNP prélevés sur les animaux sacrifiés à la fin de l'étude. Le pathologiste appréciera, en s'appuyant sur son expérience professionnelle et sur la nature des altérations observées, s'il convient d'utiliser d'autres colorations afin de repérer et de caractériser des types d'altérations particuliers [par exemple protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) ou histochimie de la lectine pour estimer les altérations gliales et microgliales (72), fluoro-jade pour détecter les nécroses (73) (74), ou coloration à l'argent spécifique de la dégénérescence neurale (75)].

42. Il convient d'effectuer une évaluation morphométrique (quantitative), car ces données peuvent contribuer à détecter un effet lié au traitement et sont utiles à l'interprétation des différences liées au traitement au niveau du poids du cerveau ou de la morphologie (76) (77). Des échantillons de tissu nerveux sont prélevés et préparés en vue d'une évaluation morphométrique. Il faut inclure, par exemple, des mesures linéaires ou surfaciques de régions spécifiques du cerveau (78). De telles mesures se pratiquent sur des coupes homologues soigneusement sélectionnées grâce à des repères microscopiques fiables (6). La stéréologie peut permettre d'identifier des effets liés au traitement sur des paramètres tels que le volume ou le nombre de cellules spécifiques de régions neuroanatomiques (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. On recherchera par l'examen des cerveaux tous les indices d'altérations neuropathologiques associés au traitement, sur des échantillons adéquats prélevés dans les principales régions du cerveau [par exemple bulbes olfactifs, cortex cérébral, hippocampe, noyaux basaux, thalamus, hypothalamus, mésencéphale (tectum, calotte, pédoncules cérébraux), pont, bulbe rachidien, cervelet], en s'efforçant de procéder à un examen exhaustif. Il est important que les coupes soient prélevées dans le même plan sur tous les animaux. Sur les adultes humainement sacrifiés à la fin de l'étude, il faut prélever des sections représentatives de la moelle épinière et du SNP. Les zones étudiées doivent comprendre l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière au niveau des renflements cervicaux et lombaires, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au niveau du genou), et les ramifications du nerf tibial au niveau des muscles du mollet. La moelle épinière et les nerfs périphériques doivent être représentés par des sections transversales et longitudinales.

▼ **M5**

44. L'évaluation neuropathologique doit comprendre un examen permettant de détecter des indices de dommages affectant le développement du système nerveux (6) (85) (86) (87) (88) (89), en plus des altérations cellulaires (par exemple vacuolisation neuronale, dégénérescence, nécrose) et des modifications tissulaires (par exemple gliose, infiltration leucocytaire, formation de kystes). À cet égard, il est important de distinguer les effets liés au traitement des événements normaux du développement qui surviennent habituellement au stade correspondant au moment du sacrifice (90). Quelques exemples d'altérations significatives, indicatrices d'effets préjudiciables au développement sont cités ci-dessous:

- modification des dimensions ou de la forme des bulbes olfactifs, des hémisphères cérébraux ou du cervelet au niveau macroscopique,
- modification des dimensions relatives des diverses régions du cerveau, notamment augmentations ou diminutions de la taille des régions s'expliquant par une perte ou une persistance de populations normalement transitoires de cellules ou de projections axoniques (par exemple couche germinale externe du cervelet, corps calleux),
- modifications de la prolifération, de la migration, et de la différenciation, révélées par des zones d'apoptose ou nécrose excessives, de populations groupées ou dispersées de neurones ectopiques, désorientés ou malformés ou d'altérations des dimensions relatives des diverses couches de structures corticales,
- modifications des modèles de myélinisation, notamment réduction de la taille globale ou modification de la coloration des structures myélinisées,
- signe d'hydrocéphalie, en particulier grossissement des ventricules, sténose de l'aqueduc de Sylvius et amincissement des hémisphères cérébraux.

Analyse de la relation dose-réponse des altérations neuropathologiques

45. Le protocole suivant est recommandé pour les analyses neuropathologiques qualitatives et quantitatives. Il s'agit d'un protocole par étapes. Premièrement, on compare des coupes du groupe de dose la plus élevée avec celles du groupe témoin. En l'absence d'observations d'altérations neuropathologiques chez les animaux du groupe de dose élevée, aucune autre analyse n'est requise. Si des preuves d'altérations neuropathologiques sont notées dans ce groupe, les animaux des groupes de doses intermédiaire et faible sont examinés. Si l'étude sur le groupe de dose élevée est interrompue par le décès ou l'observation d'une toxicité parasite sur les animaux, il faut rechercher dans les groupes de dose élevée et intermédiaire des altérations neuropathologiques. Si l'on détecte des signes de neurotoxicité dans les groupes de doses inférieures, il convient de mener l'analyse neuropathologique dans ces groupes. Pour toute altération neuropathologique liée au traitement, observée lors des examens qualitatifs ou quantitatifs, il faudra déterminer la nature dose-dépendante de l'incidence, de la fréquence et du degré de gravité des lésions ou des altérations morphométriques, en se basant sur une évaluation de tous les animaux de tous les groupes de doses. Toutes les régions du cerveau présentant un signe quelconque d'altération neuropathologique doivent être incluses dans cette évaluation. Il conviendra, pour chaque type de lésion, de décrire les caractéristiques choisies pour définir les différents degrés de gravité, en indiquant les critères employés pour différencier chaque degré. La fréquence de chaque type de lésion et son degré de gravité doivent être enregistrés et une analyse statistique permettra d'évaluer la nature de la relation dose-réponse. L'utilisation de lames codées est recommandée (91).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

46. Les données doivent être rapportées individuellement et résumées sous forme de tableau, présentant pour chaque groupe d'essai les types de modification et le nombre de mères, de descendants par sexe et de portées présentant chaque type de modification. Dans le cas d'une exposition post-natale des petits, la voie, la durée et la période d'exposition doivent être indiquées.

▼ **M5****Évaluation et interprétation des résultats**

47. L'objectif d'une étude de neurotoxicité développementale est de fournir des informations sur les effets d'une exposition répétée à une substance pendant le développement in utero et postnatal précoce. L'étude est axée tant sur la toxicité générale que sur les effets neurotoxiques sur le développement, et c'est pourquoi les résultats de l'étude devront permettre de distinguer les effets neurodéveloppementaux qui apparaissent en l'absence de toxicité maternelle générale de ceux qui ne sont exprimés qu'à des doses également toxiques pour la mère. La complexité des interrelations entre le modèle de l'étude, l'analyse statistique et la signification biologique des résultats exige l'avis d'un expert pour assurer une interprétation correcte des données de neurotoxicité pour le développement (107) (109). L'interprétation des résultats de l'essai observera une approche basée sur le poids de la preuve (20) (92) (93) (94). Il conviendra de discuter les types d'effets comportementaux ou morphologiques observés, s'ils existent, ainsi que les preuves d'une relation dose-réponse. Cette caractérisation doit inclure les données issues de toutes les études d'évaluation de la neurotoxicité pour le développement, en particulier des études épidémiologiques sur l'homme ou des rapports d'études de cas et des études sur animaux expérimentaux (par exemple données toxicocinétiques, informations sur la relation structure-activité, données issues d'autres études de toxicité). Cela comprend aussi les relations entre les doses de la substance d'essai et la présence ou l'absence, l'incidence et l'ampleur d'effets neurotoxiques, quels qu'ils soient, sur chaque sexe (20) (95).
48. L'évaluation des résultats comprendra une discussion analysant la signification biologique et la signification statistique. L'analyse statistique doit être considérée comme un outil orientant l'interprétation des données sans la déterminer totalement. Une signification statistique ne permet pas de conclure à elle seule, si elle est nulle, à l'absence d'effet lié au traitement, ni, si elle est positive, à un effet lié au traitement. Afin de se prémunir contre l'observation d'éventuels faux négatifs et contre les difficultés inhérentes à la «démonstration d'un résultat négatif», il conviendra d'inclure dans la discussion des données de témoins positifs et historiques, en particulier dans le cas d'absence d'effets liés au traitement (102) (106). La probabilité d'obtention de faux positifs doit faire l'objet d'une analyse dans le cadre de l'évaluation statistique générale des résultats (96). L'évaluation doit inclure, le cas échéant, la relation entre les altérations neuropathologiques et comportementales observées.
49. Tous les résultats devront être analysés en utilisant des modèles statistiques adaptés au protocole expérimental (108). Le choix d'une analyse paramétrique ou non paramétrique doit être justifié en tenant compte de facteurs tels que la nature des données (transformées ou non) et leur distribution, mais aussi de la robustesse relative de l'analyse statistique utilisée. Le choix des analyses statistiques doit être guidé par l'objectif et le modèle de l'étude de façon à limiter autant que possible les erreurs de type I (faux positifs) et de type II (faux négatifs) (96) (97) (104) (105). Si les études sur le développement font appel à des espèces multipares dans lesquelles plusieurs petits par portée sont soumis à l'essai, la portée doit être incluse dans le modèle statistique pour éviter l'accroissement des taux d'erreurs de type I (98) (99) (100) (101). L'unité statistique de la mesure doit alors être la portée et non le petit. Les modèles expérimentaux doivent éviter le traitement d'individus de la même portée dans des observations indépendantes. Des effets mesurés à plusieurs reprises sur le même sujet, quels qu'ils soient, doivent être analysés à l'aide de modèles statistiques qui tiennent compte de la non-indépendance de ces mesures.

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après:

Substance d'essai

— Nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques

— Données permettant son identification, notamment source

▼ **M5**

- Pureté de la préparation, et impuretés connues et/ou probables

Véhicule (le cas échéant)

- Justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit ni d'eau ni d'une solution saline physiologique

Animaux expérimentaux

- Espèces et souches utilisées, et justification si choix d'une autre espèce que le rat
- Fournisseur des animaux expérimentaux
- Nombre, âge au début de l'essai, et sexe des animaux
- Source, conditions d'hébergement, régime alimentaire, eau, etc.
- Poids de chaque animal au début de l'essai

Conditions expérimentales

- Justification du choix des doses
- Justification de la voie et de la période d'administration
- Précisions sur les doses administrées, notamment détails sur le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée
- Précisions sur la formulation de la substance d'essai et la préparation des aliments, concentration finale, stabilité et homogénéité de la préparation
- Méthode utilisée pour l'identification individuelle des mères et des descendants
- Description détaillée du ou des protocoles de randomisation employés pour affecter les mères aux groupes de traitement, pour sélectionner les petits éliminés de la portée, et affecter les petits aux groupes d'essai
- Précisions sur l'administration de la substance d'essai
- Conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans les aliments, l'eau de boisson ou le dispositif d'inhalation en dose réelle (mg/kg de masse corporelle/jour), si possible
- Conditions environnementales
- Précisions sur la qualité des aliments et de l'eau (par exemple eau du robinet, eau distillée)

- Dates de début et de fin de l'étude

Observations et protocoles d'essai

- Description détaillée des protocoles utilisés pour standardiser les observations et les protocoles, avec définitions utilisées pour la notation des observations
- Liste de tous les protocoles d'essai utilisés, et justification de leur choix
- Précisions sur les protocoles d'études comportementales et fonctionnelles, pathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques employés, y compris des informations et des détails sur les appareils automatiques
- Protocoles d'étalonnage et de vérification de l'équivalence des appareils et de répartition équilibrée des groupes de traitement dans les protocoles d'essai
- Brève justification explicitant toutes les décisions impliquant une appréciation professionnelle

▼ **M5***Résultats (individuels et globaux, avec moyenne et variance, le cas échéant)*

- Nombre d'animaux au début de l'étude et nombre à la fin de l'étude
- Nombre d'animaux et de portées utilisés pour chaque méthode d'essai
- Numéro d'identification de chaque animal et de la portée à laquelle il appartient
- Effectif de la portée et poids moyen à la naissance par sexe
- Résultats de poids corporel et de variation du poids corporel, y compris poids corporel final pour les mères et les petits
- Données sur la consommation d'aliments et la consommation d'eau, s'il y a lieu (par exemple si la substance d'essai est administrée par l'intermédiaire de l'eau)
- Résultat de réponse toxique par sexe et dose, notamment signes de toxicité ou de mortalité, y compris le moment et la cause du décès, le cas échéant
- Nature, gravité, durée, jour de la survenue, moment de la journée, et évolution ultérieure des observations cliniques détaillées
- Notation de chaque marqueur du développement (poids, maturité sexuelle et ontogénie comportementale) à chaque moment d'observation
- Description détaillée de toutes les observations de comportement, fonctionnelles, neuropathologiques, neurobiologiques, électrophysiologiques par sexe, y compris augmentations et diminutions par rapport au témoin
- Observations à l'autopsie
- Poids des cerveaux
- Tout diagnostic, déduit des signes et des lésions neurologiques, y compris les maladies ou les conditions naturelles
- Images des observations représentatives
- Images à faible grossissement permettant d'évaluer l'homologie des coupes utilisées pour la morphométrie
- Données d'absorption et de métabolisme, notamment données complémentaires issues d'une étude toxicocinétique séparée, si elle est disponible
- Traitement statistique des résultats, notamment modèles statistiques employés pour analyser les données, et résultats, qu'ils soient significatifs ou non
- Liste du personnel impliqué dans l'étude, mentionnant leur formation professionnelle

Discussion des résultats

- Information sur la relation dose-réponse, par sexe et groupe
- Lien entre chaque effet toxique et la conclusion proposée sur le potentiel neurotoxique de la substance d'essai, par sexe et groupe
- Répercussions de toutes les informations toxicocinétiques sur les conclusions
- Similitudes des effets observés avec ceux de tous les neurotoxiques connus

▼ **M5**

- Données démontrant la fiabilité et la sensibilité de la méthode de l'essai (c'est-à-dire résultats des témoins positifs et historiques)
- Relations éventuelles entre les effets neuropathologiques et fonctionnels
- CSENO ou dose de référence pour les mères et les petits, par sexe et groupe

Conclusions

- Discussion sur l'interprétation générale fondée sur les résultats, incluant une conclusion indiquant si la substance chimique d'essai est responsable ou non d'une neurotoxicité pour le développement, et indiquant la CSENO

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1995), Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity, Copenhagen, Danemark, 13-14 juin 1995.
- (2) US EPA (1998), Lignes directrices d'essai de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement, OPPTS 870.6300, Developmental Neurotoxicity Study, US EPA 712-C-98-239, disponible à l'adresse suivante: http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/
- (3) US EPA (1998), Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment, US EPA 630/R-95/001F, disponible à l'adresse suivante: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., et Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects, *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., et Mileson, B.E. (2001), Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations, *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001), Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology, *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OCDE (2003), Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing, Washington DC, US, 23-25 octobre 2000.
- (8) OCDE (2008), OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, n° 43, Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, direction de l'environnement, OCDE, Paris, juillet 2008, disponible à l'adresse suivante: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)
- (9) OCDE (2003), OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, No. 20, Guidance Document for Neurotoxicity Testing, Direction de l'environnement, OCDE, Paris, septembre 2003, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990), Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000), *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼ **M5**

- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002), Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits, *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., et Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.
- (14) Chapitre B.34 de la présente annexe, «Étude de toxicité pour la reproduction sur une génération».
- (15) Chapitre B.35 de la présente annexe, «Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations».
- (16) Chapitre B.43 de la présente annexe, «Étude de neurotoxicité chez les rongeurs».
- (17) Chapitre B.31 de la présente annexe, «Étude de la toxicité pour le développement prénatal».
- (18) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (19) OMS (1986), *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals (Environmental Health Criteria 60)*, Albany, New York: Centre des publications de l'Organisation mondiale de la santé, USA, disponible à l'adresse suivante: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>
- (20) OMS (2001), *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches (Environmental Health Criteria 223)*, publications de l'Organisation mondiale de la santé, Genève, disponible à l'adresse suivante: <http://www.intox.org/databank/documents/supplem/suppl/ehc223.htm>
- (21) Chang, L.W., et Slikker, W. (1995), *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., et Viveros, M.P. (1997), Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders, *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., et Keller, K.A. (1997), The rationale for culling of rodent litters, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., et Spyker, J.M. (1977), Foot tattoo of neonatal mice, *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, et F.J., Walker, R.F. (1989), Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., et Campbell, B.A. (1979), *Ontogeny of Learning and Memory*, ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., et Smotherman, W. (1987), *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*, Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., et Walls, I. (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., et Zoetis, T. (2005), Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group, *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., et Goodman, J.I. (1999), Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment, *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993), *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987), Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.

▼ M5

- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., et Tanimura, T. (1998), Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan, *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., et Reynolds, V.L. (1999), Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights, *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., et Parks, L. (2000), Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat, *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.
- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., et Nelson, B.K. (1985), Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., et Weiner, R.W. (1977), Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat, *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990), Neurobehavioral assessment during the early postnatal period, *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., et Sudarshan, K. (1975), Postnatal development of locomotion in the laboratory rat, *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986), Methods in Behavioral Teratology, in *Handbook of Behavioral Teratology*, Riley, E.P., et Vorhees, C.V. (eds) Plenum Press, New York, p. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., et MacPhail, R.C. (1979), Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing, *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977), A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., et Snyder, S.H., (eds), Plenum Press, New York, p. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., et Stanton, M.E. (1993), Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat, *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., et Reiter, L.W. (1985), Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes, *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., et MacPhail, R.C. (1991), Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments, *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., et Carr, G. J. (1997), Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats, *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., et Carr, G.J. (1998), A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals, *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., et Parker, V.H. (1977), A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984), The mammalian startle response, in *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, p. 287-351.
- (50) Koch, M. (1999), The neurobiology of startle, *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992), Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction, in *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., et Mitchell, C. (eds), Raven Press, New York, p. 181-211.

▼ **M5**

- (52) Crofton, K.M., et Sheets, L.P. (1989), Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., et Rebert, C.S. (1994), Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit, *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984), Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., et Ross, J.F. (1992), Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes, in *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., et Mitchell, C., (eds), Raven Press, New York, p. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., et Crofton, K.M. (1990), Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.
- (57) Bammer, G. (1982), Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results, *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988), Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats, *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., et Stanton, M.E. (1989), Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat, *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., et Spear, N.E. (1984), Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat, *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984), Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., et Yehuda, S. (1989), The use of the Morris water maze in the study of memory and learning, *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., et De Deyn, P.P. (2001), Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory, *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987), Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin, *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997), Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins, *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., et Sakaguchi, T. (1988), Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosourea induced microcephaly, *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., et Cox, C. (1983), Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., et Haroutunian, V. (1981), Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding, *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., et Garman, R.H. (2000), Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system, *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., et Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington DC, p. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., et Gamble, M. (2002), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼ M5

- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., et Switzer, R.C. (1996), Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex, *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., et Hopkins, K.J. (2000), Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration, *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., et Wurmlin, C.H. (2001), Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain, *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., et de Olmos de Lorenzo, S. (1994), Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semi-acute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma, *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., et Gundersen, H.J. (2005a), Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.
- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., et Gundersen, H.J. (2005b), 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity, *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., et Gramann, W.J. (1979), Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period, *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., et Reed, M.G. (1998), *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998), *Stereology: A practical primer for neuropathology*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57:305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., et Møller, A. (1993), Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method, *Brain Res.*, 609:262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997), Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology, *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999), Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias, *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., et Hof, P.R. (2005), Design-based stereology in neuroscience, *Neuroscience*, 130:813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., et Rodier, P.M. (1994), Patterns of growth deficiency in rats exposed in utero to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM), *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., et Shimada, M. (1995), Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum, *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, et Catalano SM. (1998), Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology, in *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., et Chang, L.W. (eds), Academic Press, New York, p. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., et Olney, J.W. (1999), Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain, *Science*, 283:70-74.

▼ **M5**

- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., et Olney, J.W. (2000), Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome, *Science*, 287:1056–1060.
- (90) Friede, R. L. (1989), *Developmental Neuropathology*, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., et Simmons, J.E. (1992), Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions, *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., et Crofton, K.M. (1996), Setting exposure standards: a decision process, *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005), *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*, US EPA NCEA-F-0644A.
- (94) US EPA (1996), *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment*, Federal Register, 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995), *Neurotoxicology, Review of Definitions, Methodology and Criteria*, Miljøprojekt nr. 282, Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., et Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., et Benignus, V.A. (1984), Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments, *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989), Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.
- (98) Abby, H., et Howard, E. (1973), Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring, *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., et Hogan, M.D. (1975), Selection of the experimental unit in teratology studies, *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., et Pearce, B. (1992), Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species, *Neurotoxicol. Teratol.*, 14:221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., et Adams, J. (1985), Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., et Raffaele, K.C. (2004), A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies, *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad hoc working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today, *Toxicol. Pathol.*, 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., et Buelke-Sam, J. (1992), The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies, *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., et Heyse, J.F. (1985), Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug, *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., et Parker, S.P. (2008), Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., et Sobrian, S.K. (2008), Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.

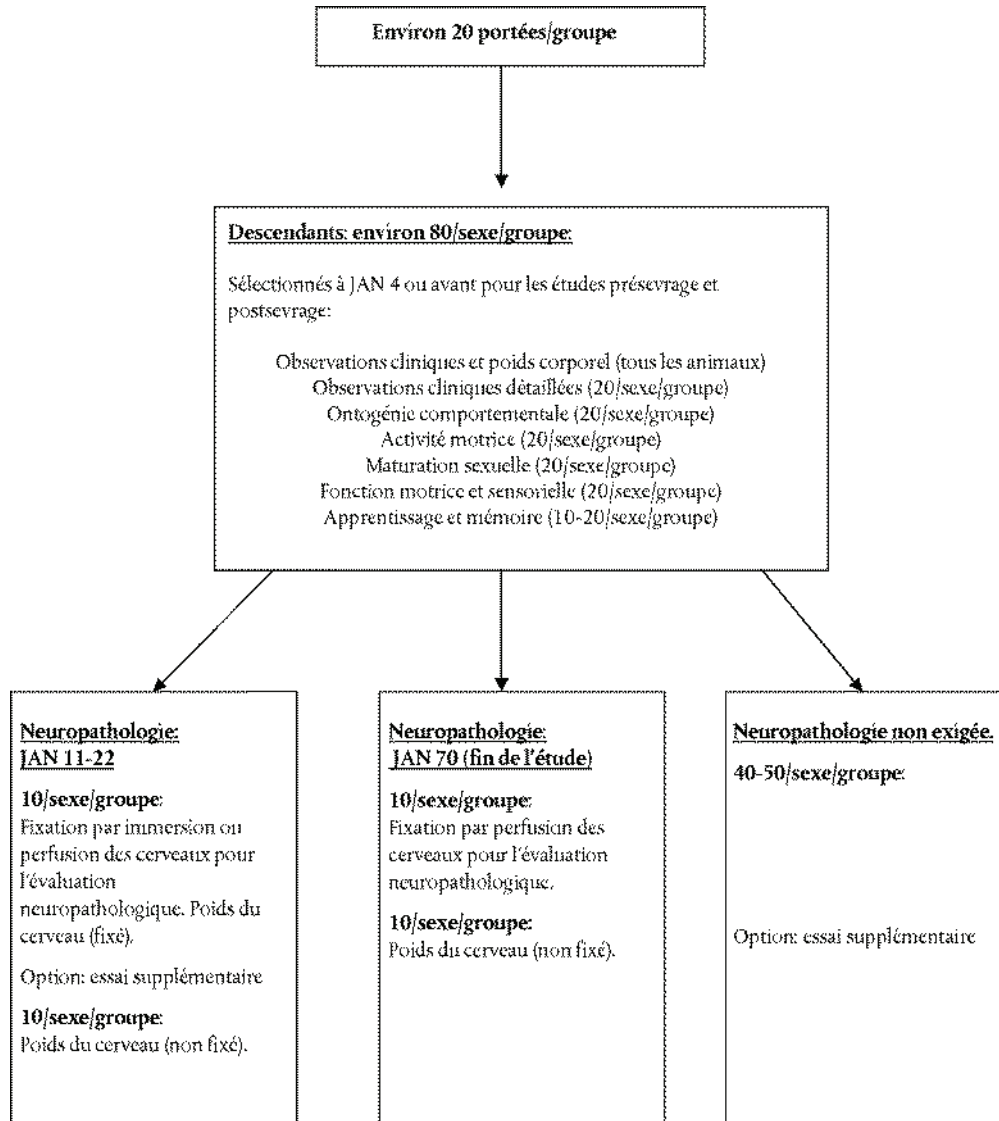
▼ M5

- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., et Phang, W. (2008), Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., et Sobotka, T.J. (2008), Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼ M5

Figure 1

Schéma général des essais fonctionnels et comportementaux, de l'évaluation neuropathologique et de la mesure des poids des cerveaux. Ce diagramme s'appuie sur la description présentée dans les paragraphes 13-15 (JAN = jour après la naissance). Des exemples de répartition des animaux sont donnés dans l'appendice 1



▼ **M5***Appendice 1*

- Des exemples de répartitions possibles sont décrits et présentés ci-dessous sous forme de tableaux. Ils sont fournis à titre d'illustration afin de démontrer que l'affectation des animaux de l'étude à divers paradigmes de l'essai peut s'effectuer selon plusieurs modes différents.

Exemple 1

- Un groupe de 20 petits/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour l'essai avant sevrage de l'ontogénie du comportement. Parmi ces animaux, dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés à JAN 22. Les cerveaux sont prélevés, pesés et soumis à un traitement de préparation pour une évaluation histopathologique. De surcroît, les résultats pondéraux concernant le cerveau sont recueillis sur des cerveaux non fixés appartenant aux 10 mâles et aux 10 femelles restants par dose.
- On utilise un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) pour les essais fonctionnels et comportementaux postsevrage (observation clinique détaillée, activité motrice, sursauts auditifs et essais de la fonction cognitive chez les adolescents) et l'évaluation de l'âge de maturité sexuelle. Dix animaux/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) de ce groupe sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation in situ, le cerveau est prélevé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.
- L'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (par exemple JAN 60-70) implique un troisième groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée). Dix animaux/sexe/groupe (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont sacrifiés à la fin de l'étude et leur cerveau est prélevé et pesé.
- Les 20 autres animaux/sexe/groupe sont réservés à d'autres essais éventuels.

Tableau 1

Petit n° ^(a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogénie du comportement
		10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 22
		10 m + 10 f	Poids du cerveau à JAN 22
2	6	20 m + 20 f	Observations cliniques détaillées
		20 m + 20 f	Activité motrice
		20 m + 20 f	Maturité sexuelle
		20 m + 20 f	Fonction motrice et sensorielle
		20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (JAN 25)
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte/neuropathologie/morphométrie ~JAN 70

▼ M5

Petit n° ^(a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes)
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte ~JAN 70
4	8	—	Animaux en réserve pour les remplacements ou d'autres essais

(a) Dans cet exemple, les portées ont été restreintes à 4 mâles + 4 femelles; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petites femelles de 5 à 8.

Exemple 2

6. Un groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour l'essai avant sevrage de l'ontogénie du comportement. Dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés parmi ces animaux à JAN 11. Les cerveaux sont prélevés, pesés et soumis à un traitement de préparation pour une évaluation histopathologique.
7. On utilise un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) pour les examens fonctionnels et comportementaux postsevrage (observations cliniques détaillées, activité motrice, évaluation de l'âge de maturité sexuelle, fonction motrice et sensorielle). Parmi ces animaux, 10 petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation in situ, le cerveau est prélevé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.
8. L'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (par exemple JAN 60-70) implique 10 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée). Des animaux différents sont utilisés pour les tests de fonction cognitive à JAN 23 et à l'âge jeune adulte. À la fin de l'étude, 10 animaux/sexe/groupe ayant été soumis aux essais sur adultes sont sacrifiés et leur cerveau est prélevé et pesé.
9. Les 20 autres animaux/sexe/groupe non sélectionnés pour les essais sont sacrifiés et éliminés au sevrage.

Tableau 2

Petit n° ^(a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontologie du comportement
		10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 11
2	6	20 m + 20 f	Observations cliniques détaillées
		20 m + 20 f	Activité motrice
		20 m + 20 f	Maturité sexuelle
		20 m + 20 f	Fonction motrice et sensorielle
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte/neuropathologie/morphométrie ~JAN 70

▼ M5

Petit n° ^(a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Apprentissage et mémoire (JAN 23)
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes) Poids du cerveau du jeune adulte
4	8	—	Animaux sacrifiés et éliminés JAN 21

^(a) Dans cet exemple, les portées ont été restreintes à 4 mâles + 4 femelles; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petites femelles de 5 à 8.

^(b) Des petits différents sont utilisés pour les tests cognitifs à JAN 23 et chez les jeunes adultes (par exemple petits surnuméraires à l'effectif de 20).

Exemple 3

10. Un groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour la pesée du cerveau et l'évaluation neuropathologique à JAN 11. Dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés à JAN 11 dans ce groupe et le cerveau est prélevé, pesé et traité à des fins d'évaluation histopathologique. En outre, des données pondérales sur le cerveau sont recueillies sur des cerveaux non fixés prélevés sur les 10 mâles et les 10 femelles restants par dose.
11. Un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour des examens d'ontogénie du comportement (activité motrice), postsevrage (activité motrice et évaluation de l'âge de la maturité sexuelle) et une analyse de la fonction cognitive chez les adolescents.
12. Un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est destiné à des essais de fonction motrice et sensorielle (sursaut auditif) et à des observations cliniques détaillées. Dix animaux/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) de ce groupe sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation in situ, le cerveau est prélevé, pesé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.
13. Un autre groupe de 20 petits/sexe/dose est utilisé pour l'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (1 mâle et 1 femelle par portée). Parmi ceux-ci, 10 animaux/sexe/groupe (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont sacrifiés à la fin de l'étude et leur cerveau est prélevé et pesé.

Tableau 3

Petit n° ^(a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
1	5	10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 11
		10 m + 10 f	Poids du cerveau à JAN 11
2	6	20 m + 20 f	Ontogénie du comportement (activité motrice)
		20 m + 20 f	Activité motrice
		20 m + 20 f	Maturité sexuelle
		20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (JAN 27)

▼ **M5**

Petit n° ^(a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Sursaut auditif (adolescents et jeunes adultes)
		20 m + 20 f	Observations cliniques détaillées
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte/neuropathologie/morphométrie ~JAN 70
4	8	20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes)
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte

^(a) Pour cet exemple, les portées sont restreintes à 4 mâles + 4 femelles; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petites femelles de 5 à 8.

▼ **M5**

Appendice 2

Définitions

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ **M5****B.54. BIOESSAI UTÉROTROPHIQUE CHEZ LES RONGEURS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DES PROPRIÉTÉS ŒSTROGÉNIQUES**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 440 (2007) de l'OCDE. L'OCDE a lancé, en 1998, une activité à caractère hautement prioritaire destinée à réviser les lignes directrices existantes et à établir une nouvelle ligne directrice concernant le dépistage des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien (1). L'un des éléments de cette activité a été de développer une ligne directrice relative au bioessai utérotophique chez le rongeur. Le bioessai utérotophique chez le rongeur a donc fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant l'établissement d'un document de référence détaillé (2) (3) et la conduite d'études intra- et interlaboratoires très complètes, destinées à montrer la pertinence et la reproductibilité du bioessai réalisé avec un puissant œstrogène de référence, des agonistes faibles des récepteurs œstrogéniques, un puissant antagoniste des récepteurs œstrogéniques, et une substance chimique de référence négative (4) (5) (6) (7) (8) (9). La présente méthode d'essai B.54 a été établie à la lumière de l'expérience acquise durant le programme de validation de l'essai et des résultats obtenus concernant les agonistes des œstrogènes.
2. Le bioessai utérotophique est un essai de dépistage à court terme qui remonte aux années 30 (27) (28) et qui a été normalisé pour la première fois en 1962 aux fins du dépistage par une commission d'experts (32) (35). Cet essai se fonde sur l'augmentation du poids utérin, encore appelée réponse utérotophique (voir 29). Il évalue la capacité d'une substance chimique à provoquer une activité biologique analogue à celle des agonistes ou antagonistes des œstrogènes naturels (17β-estradiol par exemple), mais il est toutefois beaucoup plus rarement utilisé pour la détection d'antagonistes que d'agonistes. L'utérus réagit aux œstrogènes de deux façons. La réponse initiale est un accroissement pondéral dû à l'absorption d'eau. Cette réaction est suivie par une augmentation du poids due à la croissance tissulaire (30). La réaction de l'utérus chez le rat et la souris est qualitativement comparable.
3. Ce bioessai sert de test de dépistage *in vivo* et son application doit être envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens» (appendice 2). Dans ce cadre conceptuel, le bioessai utérotophique intervient au niveau 3 en tant qu'essai *in vivo* fournissant des données sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir le pouvoir œstrogénique.
4. Le bioessai utérotophique est censé faire partie d'une batterie d'essais *in vitro* et *in vivo* destinés à identifier les substances susceptibles d'agir sur le système endocrinien, pour permettre à terme d'évaluer les risques pour la santé humaine ou l'environnement. Le programme de validation de l'OCDE a utilisé des agonistes œstrogéniques puissants et faibles pour évaluer l'aptitude de l'essai à identifier les composés œstrogéniques (4) (5) (6) (7) (8). La sensibilité de la procédure d'essai aux agonistes œstrogéniques a pu ainsi être démontrée, de même que sa bonne reproductibilité intra- et interlaboratoire.
5. En ce qui concerne les substances chimiques négatives, seule une substance chimique de référence «négative» déjà identifiée comme telle par l'essai utérotophique et les essais *in vitro* de liaison avec les récepteurs a été incluse dans le programme de validation, mais des données complémentaires, extérieures au programme de validation de l'OCDE, ont été évaluées, et ont confirmé la spécificité du bioessai utérotophique pour le dépistage d'agonistes des œstrogènes (16).

▼ **M5**

CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

6. Les agonistes et antagonistes des œstrogènes agissent comme ligands des récepteurs œstrogéniques α et β et peuvent respectivement activer ou inhiber l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Cela peut avoir des conséquences négatives pour la santé, notamment des effets sur la reproduction et le développement. Il est donc nécessaire d'évaluer rapidement les substances chimiques pour déterminer leur éventuelle activité agoniste ou antagoniste des œstrogènes. Bien qu'instructive, l'affinité d'un ligand et d'un récepteur œstrogénique ou l'activation transcriptionnelle des gènes rapporteurs *in vitro* ne représente qu'un déterminant, parmi plusieurs, d'un danger possible. Les autres facteurs déterminants peuvent être l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution entre les tissus cibles et l'élimination de l'organisme, qui dépendent, au moins en partie, de la voie d'administration et de la substance d'essai. Il est par conséquent nécessaire de dépister l'activité éventuelle d'une substance chimique *in vivo* dans des conditions appropriées, sauf si les caractéristiques ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination) de la substance chimique fournissent déjà les informations indispensables. Les tissus utérins réagissent aux œstrogènes par une croissance rapide et vigoureuse, notamment chez les rongeurs de laboratoire, dont le cycle œstral dure environ 4 jours. Les rongeurs, en particulier le rat, sont aussi largement utilisés dans les études de toxicité pour caractériser les dangers. En conséquence, l'utérus des rongeurs est un organe cible approprié pour le dépistage *in vivo* des agonistes et antagonistes des œstrogènes.

7. La présente méthode d'essai s'appuie sur les protocoles employés dans l'étude de validation de l'OCDE qui se sont révélés fiables et reproductibles dans les études intra- et interlaboratoires (5) (7). À l'heure actuelle deux méthodes sont disponibles, l'une utilisant des femelles adultes ovariectomisées (méthode adulte-ovx) et l'autre, des animaux immatures, non ovariectomisés (méthode immature). Le programme de validation des essais de l'OCDE a montré que la sensibilité et la reproductibilité de ces deux méthodes étaient comparables. Cependant, la méthode sur des femelles immatures, dont l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique (HPG) est intact, est peut-être moins spécifique mais couvre un plus large champ d'investigation que celle pratiquée sur des animaux ovariectomisés, parce qu'elle est sensible à des substances qui interagissent avec l'axe HPG et non pas uniquement avec les récepteurs aux œstrogènes. L'axe HPG de la rate est fonctionnel à partir d'environ 15 jours après la naissance. Avant cet âge, la puberté ne peut pas être accélérée par des traitements comme la GnRH. À l'approche de la puberté, avant l'ouverture du vagin, la femelle a plusieurs cycles silencieux sans ouverture vaginale ni ovulation, mais qui se manifestent par certaines fluctuations hormonales. Si une substance chimique stimule l'axe HPG directement ou indirectement durant cette période, on assiste à une puberté précoce, une ovulation précoce ou une ouverture vaginale accélérée. Les substances chimiques agissant sur l'axe HPG produiront cet effet, mais également certains régimes à niveaux d'énergie métabolisable plus élevés que les autres stimuleront la croissance et accéléreront l'ouverture vaginale sans être œstrogéniques. Ces substances n'induiront pas de réponse utéro-trophique chez les animaux adultes ovariectomisés puisque leur axe HPG ne fonctionne pas.

8. Dans un souci de protection des animaux, on privilégiera la méthode pratiquée sur des rates immatures pour éviter le prétraitement chirurgical des animaux et le risque de ne pas pouvoir utiliser les animaux manifestant des signes de précœstrus (voir le paragraphe 30).

▼ **M5**

9. La réponse utérotrrophique n'est pas entièrement d'origine œstrogénique, d'autres substances chimiques que les agonistes ou antagonistes des œstrogènes peuvent aussi intervenir. Par exemple, des doses relativement élevées de progestérone, de testostérone ou de diverses progestines synthétiques peuvent aussi induire une stimulation (30). Toutes les réactions peuvent faire l'objet d'une analyse histologique indiquant une kératinisation et une cornification du vagin (30). Indépendamment de l'origine possible de la réponse, tout bioessai utérotrrophique positif doit normalement donner lieu à des recherches plus poussées, permettant d'apporter des clarifications. Le pouvoir œstrogénique peut être confirmé par des essais *in vitro*, notamment par des essais de liaison avec les récepteurs ER et des essais d'activation transcriptionnelle, ou par d'autres essais *in vivo*, notamment l'essai de puberté chez les femelles.

10. Sachant que le bioessai utérotrrophique sert d'essai de dépistage *in vivo*, la méthode de validation adoptée a pris en compte le bien-être des animaux et retenu une stratégie d'essai par étapes. À cette fin, des efforts ont été déployés pour valider de façon rigoureuse la reproductibilité et la sensibilité du dépistage du pouvoir œstrogénique (problème majeur pour beaucoup de substances chimiques), mais peu de travaux ont été consacrés à la composante antioestrogénique de l'essai. Un seul antioestrogène, puissant, a été testé, étant donné que le nombre de substances chimiques possédant un profil clairement antioestrogénique (qui ne soit pas masqué par une activité œstrogénique) est très limité. En conséquence, la présente méthode d'essai est dédiée au protocole œstrogénique, tandis que le protocole décrivant le mode antagoniste de l'essai figure dans un document d'orientation (37). La reproductibilité et la sensibilité de l'essai pour les substances chimiques ayant une activité purement antioestrogénique seront mieux définies ultérieurement, lorsque la procédure d'essai aura été utilisée de façon routinière pendant assez longtemps et que davantage de substances présentant ce mode d'action auront été identifiées.

11. Il est reconnu que toutes les procédures faisant appel à des animaux respecteront les normes locales en matière de bien-être animal; les descriptifs des soins et traitements figurant ci-après constituent donc des normes minimales auxquelles se substitueront les réglementations locales telles que la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (38). D'autres orientations relatives au traitement humain des animaux ont été formulées par l'OCDE (25).

12. Comme dans tous les essais faisant appel à des animaux vivants, il est indispensable de s'assurer que les données sont réellement nécessaires avant de commencer l'essai. À titre d'exemple, des données peuvent être réellement nécessaires dans les deux situations suivantes:
 - risque d'exposition élevé (niveau 1 du Cadre conceptuel, appendice 2 du présent chapitre) ou éléments indiquant un pouvoir œstrogénique (niveau 2), d'où nécessité d'étudier si ces effets peuvent se produire *in vivo*,

 - effets témoignant d'un pouvoir œstrogénique aux niveaux 4 et 5 dans les essais *in vivo*, d'où nécessité de démontrer que les effets sont liés à un mécanisme œstrogénique qui ne peut être mis en évidence dans les essais *in vitro*.

13. La définition des termes utilisés dans la présente méthode d'essai figure à l'appendice 1.

▼ M5

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La sensibilité du bioessai utéro-trophique exige un dispositif d'essai dans lequel l'axe hypothalamo-pituitaire-ovarien n'est pas fonctionnel, d'où de faibles niveaux d'œstrogènes endogènes en circulation. Cela garantira un poids utérin de référence peu élevé et le plus large éventail possible de réponses aux œstrogènes administrés. Les rongeurs femelles remplissent ces conditions dans deux cas:
- i) femelles immatures, après sevrage et avant la puberté;
 - ii) jeunes femelles adultes ovariectomisées, passé le délai nécessaire à la régression des tissus utérins
15. La substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée. Des doses modulées de la substance d'essai sont administrées à au moins deux groupes d'animaux (pour plus de précisions voir le paragraphe 33); on applique un niveau de dose par groupe; la période d'administration est de 3 jours consécutifs dans la méthode sur femelles immatures et d'au minimum 3 jours consécutifs dans la méthode sur femelles adultes ovariectomisées. Les animaux sont sacrifiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Pour dépister les agonistes des œstrogènes, on mesure le rapport entre le poids utérin moyen des animaux des groupes d'essai et celui des animaux du groupe témoin qui a reçu le véhicule pour déterminer s'il existe une augmentation statistiquement significative. Une augmentation statistiquement significative du poids utérin moyen d'un groupe d'essai indique une réponse positive à ce bioessai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce animale

16. Les souches de rongeurs utilisées communément en laboratoire peuvent convenir. Par exemple, les souches de rats Sprague-Dawley et Wistar ont été utilisées pour la validation. Il conviendra de ne pas utiliser les souches pour lesquelles on sait ou on suspecte que l'utérus est moins réactif. Le laboratoire doit démontrer la sensibilité de la souche utilisée comme indiqué aux paragraphes 26 et 27.
17. Depuis les années 30, le rat et la souris sont utilisés de façon routinière pour le bioessai utéro-trophique. Les études de validation de l'OCDE ont été effectuées seulement sur des rats, étant entendu que ces deux espèces sont en principe équivalentes et qu'une seule devrait suffire pour la validation mondiale, l'idée étant d'économiser les ressources et de préserver les animaux. L'espèce retenue pour la plupart des études de toxicité pour la reproduction et le développement est le rat. Sachant qu'on dispose d'une riche base de données rétrospectives concernant la souris et, pour élargir le champ d'application de la méthode d'essai relative au bioessai utéro-trophique chez les rongeurs, une étude de validation complémentaire limitée a été effectuée sur la souris (16). On a adopté une approche comparative faisant intervenir un nombre limité de substances d'essai et de laboratoires, sans tests d'échantillons codés, de façon à respecter l'intention première d'économiser les ressources et de préserver les animaux. L'étude comparative de validation du bioessai utéro-trophique chez la jeune femelle de souris adulte ovariectomisée indique une bonne correspondance qualitative et quantitative des données obtenues chez le rat et chez la souris. Lorsque les résultats du bioessai utéro-trophique sont obtenus préalablement à une étude à long terme, cela permet d'utiliser les animaux de la même souche et de la même source dans les deux études. L'approche comparative n'a été utilisée que sur la souris ovariectomisée et l'ensemble de données fournies dans le rapport n'est pas assez solide pour valider le modèle sur la souris femelle immature, c'est pourquoi ce modèle n'entre pas dans le champ d'application de la présente méthode d'essai.

▼ **M5**

18. Ainsi, dans certains cas, la souris pourra être utilisée à la place du rat. Ce choix devra être justifié par des données toxicologiques, pharmacocinétiques et/ou par d'autres critères. Il pourra nécessiter certaines modifications du protocole. Par exemple, la consommation alimentaire d'une souris rapportée à son poids corporel est plus élevée que celle d'une rate, c'est pourquoi la quantité de phytoestrogènes contenue dans les aliments devra être plus faible pour la souris que pour le rat (9) (20) (22).

Conditions d'élevage et d'alimentation

19. Toutes les procédures doivent être conformes aux normes locales relatives à l'entretien des animaux de laboratoire. Les conditions d'entretien et de traitement décrites ici sont des normes minimales et seront remplacées par la réglementation applicable, notamment la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (38). La température du local expérimental doit être de 22 °C (\pm 3 °C). Le taux d'humidité relative devrait être d'au moins 30 % et, de préférence, ne pas dépasser 70 % en dehors des heures de nettoyage du local. On s'efforcera de maintenir le taux d'humidité entre 50 et 60 %. Un éclairage artificiel est utilisé. La séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.
20. Les animaux recevront de la nourriture et de l'eau potable à volonté. Les jeunes animaux adultes peuvent être placés dans des cages individuelles ou collectives pouvant contenir jusqu'à 3 individus. Compte tenu de leur jeune âge, les animaux immatures seront de préférence placés dans des cages collectives.
21. On sait que les aliments pour animaux de laboratoire contenant des niveaux élevés de phytoestrogènes font augmenter le poids utérin chez les rongeurs dans des proportions suffisantes pour interférer avec le bioessai utéro-trophique (13) (14) (15). Des taux élevés de phytoestrogènes et d'énergie métabolisable dans la nourriture de laboratoire peuvent aussi induire une puberté précoce si l'on utilise des animaux immatures. La présence de phytoestrogènes résulte principalement de l'inclusion de soja et d'alfalfa dans les mélanges de laboratoire, et il a été constaté que les concentrations de phytoestrogènes variaient selon les lots de mélange standard (23). Le poids corporel est une variable importante, étant donné que la quantité de nourriture consommée lui est corrélée. Par conséquent, la dose de phytoestrogène effectivement consommée avec le même régime peut varier selon les espèces et les âges (9). En ce qui concerne les rats femelles immatures, la consommation alimentaire rapportée au poids corporel peut représenter près du double de celle des jeunes femelles adultes ovariectomisées. Pour les jeunes souris adultes, la consommation alimentaire rapportée au poids corporel peut représenter environ quatre fois celle des jeunes rates adultes ovariectomisées.
22. Les résultats du bioessai utéro-trophique (9) (17) (18) (19) indiquent toutefois que de faibles quantités de phytoestrogènes sont acceptables dans la nourriture et ne réduisent pas la sensibilité du bioessai. À titre indicatif, les quantités de phytoestrogènes dans les aliments ne doivent pas dépasser 350 µg d'équivalents génistéine/gramme de mélange de laboratoire pour les rates immatures Sprague Dawley et Wistar (6) (9). Ce régime devrait aussi convenir pour les essais sur les jeunes rates adultes ovariectomisées, car la consommation de nourriture rapportée au poids corporel est moins importante chez les jeunes adultes que chez les animaux immatures. Si l'on doit utiliser des souris adultes ovariectomisées ou des rates plus sensibles aux phytoestrogènes, il faudra envisager de réduire les niveaux de phytoestrogènes en conséquence (20). De plus, les quantités différentes d'énergie métabolisable dans les différents régimes peuvent décaler le début de la puberté (21) (22).

▼ **M5**

23. Avant de commencer l'étude, le régime alimentaire sera soigneusement établi en veillant à éviter les taux élevés de phytoestrogènes [voir (6) (9)] ou d'énergie métabolisable, qui peuvent fausser les résultats (15) (17) (19) (22) (36). Il importe de contrôler ces deux facteurs pour assurer la bonne marche du dispositif d'essai utilisé par le laboratoire conformément aux paragraphes 26 et 27. Par mesure de sécurité et en application des bonnes pratiques de laboratoire, un échantillon représentatif de chaque lot de nourriture administré durant l'étude sera prélevé pour permettre une analyse de la présence de phytoestrogènes (par exemple en cas de poids utérin élevé chez les animaux témoins par rapport aux données précédentes, ou de réponse inadéquate à l'œstrogène de référence, 17 α -éthinyloestradiol). Les aliquotes doivent être analysées dans le cadre de l'étude ou congelées à – 20 °C ou conservées selon une méthode permettant d'éviter que l'échantillon ne se décompose avant analyse.
24. Certains types de litières peuvent contenir des substances œstrogéniques ou antiœstrogéniques à l'état naturel (par exemple, on sait que la rafle de maïs influe sur le cycle des rates et pourrait avoir des effets antiœstrogéniques). Le type de litière choisi devra contenir le moins possible de phytoestrogènes.

Préparation des animaux

25. Les animaux d'expérience, choisis après avoir vérifié qu'ils ne présentent pas de signes de maladie ni d'anomalie physique, sont répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être disposées de façon à réduire le plus possible les effets éventuels de leur emplacement. Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle. Pendant la période d'acclimatation, les animaux immatures doivent être gardés dans des cages avec leurs mères ou d'autres femelles allaitantes jusqu'à ce qu'ils soient sevrés. La période d'acclimatation précédant le début de l'expérience doit durer environ 5 jours pour les jeunes femelles adultes et pour les animaux immatures livrés avec leur mère ou d'autres femelles. Si les animaux immatures sont livrés sans leur mère et déjà sevrés, la période d'acclimatation devra être plus courte puisque l'administration doit commencer immédiatement après le sevrage (voir le paragraphe 29).

PROCÉDURE**Vérification des compétences du laboratoire**

26. Deux options sont possibles pour vérifier les compétences d'un laboratoire:
- Opérer une vérification périodique, en se référant à une étude initiale de contrôle positif (voir le paragraphe 27). Au moins tous les 6 mois et chaque fois qu'un changement risque d'influer sur les résultats de l'essai (nouvelle formulation du mélange alimentaire, modification du personnel chargé des dissections, changement de souche animale ou de fournisseur, etc.), la sensibilité du dispositif (modèle animal) doit être vérifiée en utilisant une dose adéquate (conformément à l'étude de contrôle positive décrite au paragraphe 27) de l'œstrogène de référence: 17 α -éthinyloestradiol (n° CAS 57-63-6) (EE).
 - Opérer des contrôles concomitants, en incluant un groupe recevant une dose appropriée de l'œstrogène de référence dans chaque essai.

Si le dispositif ne produit pas la réponse attendue, les conditions expérimentales devront être revues et modifiées en conséquence. Pour les deux approches, la dose de l'œstrogène de référence recommandée doit correspondre approximativement à la dose efficace 70 à 80.

▼ M5

27. Étude de référence — témoin positif: Avant d'effectuer pour la première fois une étude suivant la présente méthode d'essai, chaque laboratoire doit démontrer ses compétences en testant la sensibilité du modèle animal et en établissant la relation dose-effet pour un œstrogène de référence, le 17 α -éthynylestradiol (n^o CAS 57-63-6) (EE) avec au minimum quatre doses. L'effet sur le poids utérin sera comparé aux données historiques attestées [voir référence (5)]. Si l'étude de référence ne donne pas les résultats escomptés, les conditions de l'expérience devront être revues et modifiées.

Nombre et répartition des animaux

28. Chaque groupe d'essai et de référence doit comprendre au moins 6 animaux (pour les protocoles des méthodes sur femelles immatures et ovariectomisées).

Âge des animaux immatures

29. Pour le bioessai utérotrophique pratiqué sur des animaux immatures, le jour de la naissance doit être spécifié. L'administration de la substance d'essai doit commencer assez tôt pour faire en sorte que, à la fin de la période d'administration, l'augmentation physiologique des œstrogènes endogènes associée à la puberté n'ait pas commencé. D'un autre côté, il a été constaté que les très jeunes animaux peuvent être moins réactifs. Pour définir l'âge optimal des animaux d'essai, chaque laboratoire doit se reporter à son corpus de données de référence sur la maturation.

En règle générale, le traitement des rats peut commencer immédiatement après un sevrage précoce, au jour 18 après la naissance (le jour de la naissance étant le jour 0). Il doit s'arrêter de préférence au jour 21 après la naissance, mais dans tous les cas avant le jour 25 après la naissance, car, au-delà, l'axe hypothalamo-pituitaire-ovarien devient fonctionnel et les taux d'œstrogènes endogènes peuvent commencer à augmenter avec accroissement concomitant des poids utérins moyens et augmentation des écarts types (2) (3) (10) (11) (12).

Procédure d'ovariectomie

30. Dans l'essai sur les rats et les souris femelles ovariectomisées (groupes d'essai et groupes témoins), l'ovariectomie doit être pratiquée entre 6 et 8 semaines d'âge. Chez le rat, 14 jours au minimum doivent s'écouler entre l'ovariectomie et la première administration afin de permettre la régression de l'utérus à un poids minimum de référence stable. Chez la souris, 7 jours au minimum doivent s'écouler entre l'ovariectomie et le premier jour de traitement. Une petite quantité de tissu ovarien suffit à produire des taux élevés d'œstrogènes en circulation (3), c'est pourquoi les animaux doivent être contrôlés avant l'essai, en observant les cellules épithéliales prélevées dans le vagin pendant au moins 5 jours consécutifs (par exemple du 10^e au 14^e jour après ovariectomie pour les rates). Si les animaux présentent des signes de préœstrus, ils ne doivent pas être utilisés. Ultérieurement, lors de la nécropsie, les moignons ovariens doivent être examinés pour repérer s'il reste du tissu ovarien. Si c'est le cas, les données de l'animal ne doivent pas être prises en compte dans les calculs (3).
31. L'ovariectomie est opérée sur l'animal couché sur le ventre, qui aura été convenablement anesthésié. La paroi abdominale dorsolatérale est incisée sur environ un centimètre au point médian entre la limite costale inférieure et la crête iliaque, à quelques millimètres de la marge latérale du muscle lombaire. Les ovaires sont extraits de la cavité abdominale, déposés sur un champ aseptique puis détachés au niveau de la jonction de l'oviducte et du corps utérin. Après avoir vérifié qu'aucun saignement important ne se produit, on recoud la paroi abdominale puis la peau est refermée par des autoclips ou par suture. Les points de ligature sont indiqués schématiquement à la figure 1. Une analgésie postopératoire appropriée recommandée par un vétérinaire spécialiste des rongeurs doit être pratiquée.

▼ M5**Poids corporel**

32. Dans la méthode sur animaux adultes ovariectomisés, le poids corporel et le poids utérin ne sont pas corrélés parce que le poids utérin est affecté par des hormones telles que les œstrogènes, mais pas par les facteurs de croissance qui régulent la taille du corps. Dans le modèle sur animaux immatures au contraire, le poids corporel est corrélé au poids utérin, pendant la période de maturation (34). Par conséquent, au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés, dans le modèle sur animaux immatures, doit être minimale et ne pas excéder $\pm 20\%$ du poids moyen. Cela signifie que la taille des portées doit être standardisée par l'éleveur pour garantir que les petits de mères différentes sont nourris sensiblement de la même façon. Les animaux sont répartis de façon aléatoire par groupes (témoin et d'essai), de façon à ce qu'il n'y ait aucune différence statistique entre le poids corporel moyen des différents groupes. Il conviendra d'éviter dans la mesure du possible de mettre plusieurs animaux d'une même portée dans le même groupe de traitement, sans que cela fasse augmenter le nombre de portées nécessaires à l'étude.

Dosage

33. Deux groupes de dose et un groupe témoin suffisent habituellement pour établir si une substance d'essai peut avoir une action œstrogénique *in vivo*, et on préférera donc cette méthode pour des raisons de protection des animaux. Si l'objectif est d'obtenir une courbe de la relation dose-effet ou d'extrapoler les résultats à des doses plus faibles, au moins 3 groupes de dose seront nécessaires. Si l'on souhaite obtenir des informations plus poussées sur l'activité œstrogénique (estimation du pouvoir œstrogénique, par exemple), un autre système de dosage devra être envisagé. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin devront avoir exactement le même traitement que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance d'essai, le groupe témoin doit recevoir la même quantité du véhicule utilisé que les groupes traités (ou le volume le plus important administré si les groupes ne reçoivent pas les mêmes doses).
34. L'objectif, dans le cas du bioessai utéro-trophique, est de choisir des doses qui assurent la survie des animaux et n'entraînent pas de détresse ni d'effets toxiques graves après 3 jours consécutifs d'administration de la substance chimique, jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/j. Tous les niveaux de dose doivent être proposés et sélectionnés à la lumière des données existantes sur la toxicité et le comportement (toxico)-cinétique du composé testé ou des substances de même nature. Le niveau de dose le plus élevé doit être établi tout d'abord en fonction de la DL50 et/ou des informations sur la toxicité aiguë afin d'éviter le décès et la détresse ou la souffrance extrêmes des animaux (24) (25) (26). La dose la plus élevée doit représenter la dose maximale tolérée (MTD); une étude menée avec un niveau de dose ayant induit une réaction utéro-trophique positive pourra aussi être acceptée. Pour opérer la sélection, on accepte généralement de larges intervalles entre les dosages (une demi-unité logarithmique, soit un facteur de progression de 3,2 ou même jusqu'à une unité logarithmique). En l'absence de données appropriées, une étude de détermination de l'ordre de grandeur peut être effectuée pour aider à définir les doses qu'il convient d'utiliser.
35. Autre solution, si l'activité œstrogénique d'un agoniste peut être estimée d'après des données *in vitro* (ou *in silico*), celles-ci pourront être prises en considération pour établir les doses. Par exemple, la quantité de substance chimique d'essai qui produira une réaction utéro-trophique équivalente à celle de l'agoniste de référence (éthinyloestradiol) est estimée d'après son activité évaluée *in vitro* par rapport à celle de l'éthinyloestradiol. La dose d'essai la plus élevée sera obtenue en multipliant cette dose équivalente par un facteur adéquat (10 ou 100, par exemple).

▼ M5**Détermination de l'ordre de grandeur**

36. Le cas échéant, une étude de détermination de l'ordre de grandeur peut être effectuée sur un petit nombre d'animaux. À cet égard, le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (25) qui définit les signes cliniques indicateurs de toxicité ou de détresse des animaux peut être utilisé. Si cela est réalisable dans le cadre de cette étude de détermination, après 3 jours de traitement, les utérus peuvent être excisés et pesés environ 24 heures après la dernière dose. Ces données peuvent ensuite être utilisées pour mettre au point l'étude principale (définir les doses maximales et minimales acceptables et recommander le nombre de groupes de dose).

Administration des doses

37. La substance d'essai est administrée par gavage ou injection sous-cutanée. La voie d'administration sera déterminée en tenant compte de considérations relatives au bien-être des animaux, et aux aspects toxicologiques tels que le rapport avec l'exposition humaine à la substance chimique (gavage oral pour une exposition par ingestion, injection sous-cutanée pour une exposition par inhalation ou adsorption cutanée), les propriétés physiques/chimiques de la substance d'essai et surtout les informations toxicologiques existantes et les données sur le métabolisme et le comportement cinétique (par exemple la nécessité d'éviter le métabolisme de premier passage, meilleure efficacité d'une voie d'administration plutôt que d'une autre).
38. Il est recommandé, chaque fois que cela est possible, d'envisager pour commencer l'utilisation d'une solution/suspension aqueuse. Toutefois, les ligands des récepteurs aux œstrogènes ou leurs précurseurs métaboliques sont généralement hydrophobes, c'est pourquoi on utilise le plus souvent une solution/suspension huileuse (huile de maïs, d'arachide, de sésame ou d'olive). Ces différentes huiles n'ont toutefois pas la même valeur calorique, ni la même teneur en matières grasses, c'est pourquoi le véhicule peut influencer sur l'apport total d'énergie métabolisable et peut donc potentiellement modifier les paramètres mesurés, notamment le poids utérin, surtout dans la méthode sur animaux immatures (33). Ainsi, avant de commencer l'étude, le véhicule retenu doit être testé au regard de témoins sans véhicule. Les substances d'essai peuvent être dissoutes dans une quantité minimale d'éthanol à 95 % ou d'autres solvants appropriés, puis diluées dans le véhicule de l'essai aux concentrations finales voulues. Les caractéristiques toxiques du solvant doivent être connues et contrôlées sur un groupe témoin traité uniquement avec le solvant. Si la substance d'essai est considérée comme stable, on peut légèrement chauffer le mélange et le soumettre à une action mécanique vigoureuse pour faciliter sa dissolution. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée. Si la substance d'essai est stable pendant toute la durée de l'étude, une aliquote de la substance d'essai peut être préparée, après quoi les dilutions spécifiées sont préparées quotidiennement.
39. Le calendrier d'administration dépend du modèle d'essai (voir le paragraphe 29 pour l'essai sur animaux immatures et le paragraphe 30 pour l'essai sur animaux ovariectomisés). La substance d'essai est administrée quotidiennement aux rates immatures pendant 3 jours consécutifs. Un traitement de 3 jours est également recommandé pour les rates ovariectomisées, mais des expositions plus longues peuvent être aussi acceptées et favoriser la détection de substances faiblement actives. Sur les souris femelles ovariectomisées, 3 jours de traitement doivent suffire et il ne semble pas très intéressant de porter la durée du traitement à 7 jours pour les agonistes d'œstrogènes puissants; toutefois, l'étude de validation n'a pas permis d'établir cette relation pour les œstrogènes de plus faible activité (16), aussi la durée d'administration doit-elle être prolongée jusqu'à 7 jours consécutifs chez les souris ovariectomisées. Le produit doit être administré chaque jour à heure fixe. L'administration doit se faire de façon à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux (mg de substance d'essai par kg de poids corporel par jour). On réduira au minimum la variabilité du volume d'essai par rapport au poids corporel en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses et pour toutes les voies d'administration.

▼ **M5**

40. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux reçoivent une seule dose quotidienne à l'aide 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'essai. Les directives locales d'entretien des animaux doivent être observées, mais le volume ne doit pas excéder 5 ml/kg de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel.
41. Lorsque la substance d'essai est administrée par injection sous-cutanée, les animaux reçoivent une seule dose quotidienne. Les doses doivent être injectées dans la région dorso-scapulaire ou lombaire à l'aide d'une aiguille stérile (de calibre 23 ou 25) et d'une seringue tuberculine. Le rasage du site d'injection est facultatif. Toute perte ou fuite au moment de l'injection ou toute administration incomplète doivent être consignées. Le volume total injecté par rate par jour ne doit pas dépasser 5 ml/kg de poids corporel, répartis entre 2 sites d'injection, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel.

Observations*Observations générales et cliniques*

42. Des observations cliniques générales doivent être effectuées au moins une fois par jour, et plus fréquemment si des signes de toxicité sont constatés. Ces observations doivent être effectuées de préférence chaque jour à la (aux) même(s) heure(s) et en tenant compte du moment où les effets devraient être le plus marqués après l'administration des doses. Tous les animaux sont soumis à des observations pour contrôler la mortalité, la morbidité et les signes cliniques généraux tels que les changements de comportement, les changements au niveau de la peau, du pelage, des yeux et des muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et les activités végétatives (larmolement, piloérection, taille des pupilles, respiration inhabituelle, par exemple).

Poids corporel et consommation alimentaire

43. Tous les animaux doivent être pesés quotidiennement à 0,1 g près, en commençant juste avant le début du traitement c'est-à-dire au moment de la répartition des animaux par groupes. La quantité de nourriture consommée durant la période de traitement peut aussi être mesurée cage par cage en pesant les distributeurs d'aliments. Ces données d'alimentation facultatives doivent être exprimées en grammes par rat par jour.

Dissection et pesage de l'utérus

44. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, les rats sont euthanasiés. Idéalement, le sacrifice est effectué de façon aléatoire entre les groupes pour éviter de faire passer en premier ou en dernier l'un ou l'autre groupe, ce qui pourrait légèrement affecter les données. L'objectif du bioessai est de mesurer le poids des utérus séchés et frais. Le poids frais est celui de l'utérus et du fluide luminal. Le poids «séché» est mesuré après avoir exprimé et éliminé le contenu luminal de l'utérus.
45. Avant la dissection, le vagin sera contrôlé pour repérer une éventuelle ouverture chez les animaux immatures. La procédure de dissection commence par l'ouverture de la paroi abdominale au niveau de la symphyse pubienne. S'ils sont présents, les cornes utérines et les ovaires sont détachés de la paroi abdominale dorsale. La vessie et les uretères sont dégagés de la face ventrale et latérale de l'utérus et du vagin. Les adhérences fibreuses entre le rectum et le vagin sont libérées jusqu'à ce qu'on repère la jonction de l'orifice vaginal et du périnée. L'utérus et le vagin sont détachés du corps par incision de la paroi vaginale juste au-dessus de la jonction du périnée,

▼ M5

comme indiqué à la figure 2. L'utérus doit être détaché du corps en découpant soigneusement le mésentère à son point d'attache sur toute la longueur de la façade dorsolatérale de chaque corne. Après extraction de l'utérus, la manipulation doit être assez rapide pour éviter la dessiccation des tissus. La perte de poids due à la dessiccation devient plus importante avec des tissus minces tels que l'utérus (23). S'ils sont présents, les ovaires sont détachés au niveau de l'oviducte en évitant l'écoulement de fluide luminal de la corne utérine. Si l'animal a été ovariectomisé, les cicatrices seront examinées pour repérer l'éventuelle présence de tissu ovarien. La graisse excédentaire et le tissu conjonctif doivent être éliminés. Le vagin est détaché de l'utérus juste à la base du col de l'utérus pour que celui-ci reste solidaire du corps utérin comme indiqué à la figure 2.

46. Chaque utérus doit être transféré dans un récipient pesé portant un marquage individuel (boîte de Petri ou nacelle de pesée en plastique) en continuant de veiller à ce qu'il ne se dessèche pas avant la pesée (un filtre papier légèrement imbibé de solution saline peut être placé au fond du récipient). L'utérus et le fluide luminal seront pesés à 0,1 mg près (poids frais).
47. Chaque utérus sera ensuite traité individuellement pour extraire le fluide luminal. Les deux cornes utérines seront percées ou sectionnées selon un axe longitudinal. L'utérus sera placé sur un filtre en papier légèrement humidifié (Whatman n° 3, par exemple) puis comprimé doucement avec un second morceau de filtre en papier légèrement humidifié, jusqu'à élimination complète du fluide luminal. L'utérus vidé de son contenu luminal sera ensuite pesé à 0,1 mg près (poids séché).
48. Le poids utérin en fin d'essai peut être utilisé pour vérifier que les rates immatures intactes n'ont pas dépassé l'âge applicable, bien que les données historiques de la souche utilisée par le laboratoire soient déterminantes à cet égard (voir le paragraphe 56 pour l'interprétation des résultats).

Études optionnelles

49. Après avoir été pesé, l'utérus peut être placé dans du formol à 10 % tamponné à pH neutre pour examen histopathologique après coloration hématoxyline-éosine. Le vagin peut être aussi examiné (voir le paragraphe 9). Des mesures morphométriques peuvent être par ailleurs effectuées sur l'épithélium endométrial pour opérer des comparaisons quantitatives.

DONNÉES ET RAPPORT D'ESSAIS**Données**

50. Les informations suivantes doivent être fournies:

- le nombre d'animaux au début de l'essai,
- le nombre et l'identité des animaux retrouvés morts pendant l'essai ou euthanasiés en raison de leurs souffrances, ainsi que la date et l'heure des décès des animaux morts naturellement ou euthanasiés,
- le nombre et l'identité des animaux présentant des signes de toxicité, et une description des signes de toxicité observés indiquant notamment la date et l'heure de l'apparition, la durée et la sévérité des effets toxiques, et
- le nombre et l'identité des animaux présentant des lésions, et une description du type de lésions.

▼ **M5**

51. Les données suivantes doivent être consignées pour chaque animal: poids corporels, poids utérin frais et poids de l'utérus séché. Des analyses statistiques unilatérales pour les agonistes doivent être utilisées pour déterminer si l'administration d'une substance d'essai provoque une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) du poids utérin. Les analyses statistiques requises doivent être effectuées pour étudier les modifications liées au traitement, des poids des utérus frais et séchés. Par exemple, les données peuvent être évaluées par une analyse de covariance (ANCOVA), la covariable étant le poids corporel à la nécropsie. Une transformation logarithmique stabilisant la variance peut être opérée sur les données utérines avant l'analyse des données. Le test de Dunnett et Hsu peut être utilisé pour opérer des comparaisons par paires entre les groupes traités et les groupes témoins et pour calculer les intervalles de confiance. Une analyse des résidus studentisés peut permettre de détecter les éventuelles valeurs aberrantes et d'évaluer l'homogénéité des variances. Ces procédures ont été appliquées dans le programme de validation de l'OCDE à l'aide de la PROC GLM du Système d'analyse statistique (SAS Institute, Cary, NC), version 8 (6) (7).

52. Le rapport final doit contenir les informations suivantes:

Établissement réalisant l'essai

- Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun
- Données de l'étude de référence — témoin positif et données périodiques de contrôle positif (voir les paragraphes 26 et 27)

Substance d'essai

- Caractérisation des substances d'essai
- Nature physique et, le cas échéant, propriétés physico-chimiques utiles pour la conduite de l'essai
- Méthode et fréquence de préparation des dilutions
- Données obtenues sur la stabilité
- Analyses des solutions administrées

Véhicule

- Caractérisation du véhicule de l'essai (nature, fournisseur et lot)
- Justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau)

Animaux d'expérience

- Espèce et souches utilisées et justification du choix de ces espèces/souches
- Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur
- Âge à la livraison et date de naissance
- Si les animaux sont immatures, sont-ils fournis avec leurs mères ou d'autres femelles allaitantes et date du sevrage ?
- Détails des procédures d'acclimatation des animaux
- Nombre d'animaux par cage
- Données détaillées et méthode d'identification des individus et des groupes d'animaux

Conditions de l'essai

- Détails de la procédure de randomisation (par exemple méthode utilisée)
- Justification de la sélection des doses

▼ M5

- Détails de la formulation de la substance d'essai, concentrations obtenues, stabilité et homogénéité
- Détails relatifs à l'administration de la substance d'essai et justification de la voie d'exposition
- Alimentation (nom, type, fournisseur, composition et, s'ils sont connus, taux de phytoestrogènes)
- Eau distribuée (eau du robinet ou eau filtrée, par exemple) et mode d'administration (par tube alimenté par un grand réservoir, flacons, etc.)
- Litière (nom, type, fournisseur, composition)
- Données sur les conditions d'encagement, photopériode, température et humidité du local expérimental, nettoyage du local expérimental
- Description détaillée des procédures de nécropsie et de pesée des utérus
- Description des procédures statistiques

*Résultats**Pour chaque animal*

- Relevés journaliers du poids corporel (de la répartition en groupes jusqu'à la nécropsie) (à 0,1 g près)
- Âge de chaque animal (en jours à compter du jour 0, jour de la naissance) au début du traitement
- Date et heure de l'administration de chaque dose
- Volume calculé et dose administrée et observations de toute perte de produit pendant ou après l'administration
- Observations journalières sur l'état de l'animal, notamment symptômes pertinents
- Cause présumée du décès (si l'animal est trouvé mort ou moribond pendant l'étude)
- Date et heure de l'euthanasie et temps écoulé depuis l'administration de la dernière dose
- Poids utérin frais (à 0,1 mg près) et observations concernant les éventuels écoulements de fluide luminal pendant la dissection et la préparation avant pesée
- Poids utérin séché (à 0,1 mg près)

Pour chaque groupe d'animaux

- Relevés journaliers du poids corporel moyen (à 0,1 g près) et écarts types (de la répartition en groupes jusqu'à la nécropsie)
- Poids utérins moyens, frais et séché (à 0,1 mg près) et écarts types
- Si elle a été mesurée, consommation alimentaire journalière (calculée en grammes de nourriture consommée par animal)

▼ **M5**

- Les résultats des analyses statistiques comparant les poids utérins frais et séchés des groupes traités par rapport à ceux des groupes témoins qui ont reçu le véhicule.

- Les résultats des analyses statistiques comparant le poids corporel total et la prise de poids corporel des groupes traités par rapport à ceux des groupes témoins qui ont reçu le véhicule.

53. Résumé des principaux éléments et conditions de la méthode d'essai

	Rat	Souris
Animaux		
Souche	Souches de rongeurs de laboratoire communément utilisées	
Nombre d'animaux	6 animaux par groupe de dose au minimum	
Nombre de groupes	Au minimum 2 groupes d'essai (voir le paragraphe 33) et un groupe témoin négatif Pour les groupes témoins positifs, se référer aux paragraphes 26 et 27	
Conditions d'encagement et d'alimentation		
T° du local expérimental	22 °C ± 3 °C	
Humidité relative	50-60 %, pas moins de 30 % et pas plus de 70 %	
Photopériode journalière	12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité	
Alimentation et eau potable	À volonté	
Encagement	Individuel ou par groupes de jusqu'à 3 animaux (l'hébergement collectif est recommandé pour les animaux immatures)	
Alimentation et litière	Faibles niveaux de phytoestrogènes recommandés dans la nourriture et la litière	
Protocole		
Méthode	Méthode utilisant des femelles immatures non ovariectomisées (méthode à privilégier) Méthode utilisant des femelles adultes ovariectomisées	Méthode utilisant des femelles adultes ovariectomisées
Âge de traitement des animaux immatures	Pas avant le jour 18 après la naissance. Le traitement doit être achevé avant le jour 25 après la naissance	Non applicable pour cette méthode d'essai
Âge à l'ovariectomie	Entre 6 et 8 semaines d'âge	
Âge de traitement des animaux ovariectomisés	Il doit s'écouler au minimum 14 jours entre l'ovariectomie et le 1er jour du traitement	Il doit s'écouler au minimum 7 jours entre l'ovariectomie et le 1er jour du traitement
Poids corporel	La variation du poids corporel doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen	

▼ M5

	Rat	Souris
Administration		
Voie d'administration	Gavage oral ou injection sous-cutanée	
Fréquence de l'administration	Une dose journalière	
Volume administré par gavage et injection	≤ 5 ml/kg de poids corporel (ou jusqu'à 10 ml/kg de poids corporel dans le cas de solutions aqueuses) (sur 2 sites d'injection par voie sous-cutanée)	
Durée de la période d'administration	3 jours consécutifs pour le modèle sur animaux immatures Au minimum 3 jours consécutifs pour le modèle sur animaux ovariectomisés	7 jours consécutifs pour le modèle sur animaux ovariectomisés
Date du sacrifice	Environ 24 heures après la dernière dose	
Résultats		
Réponse positive	Augmentation statistiquement significative du poids moyen de l'utérus (frais et/ou séché)	
Œstrogène de référence	17 α -éthynylestradiol	

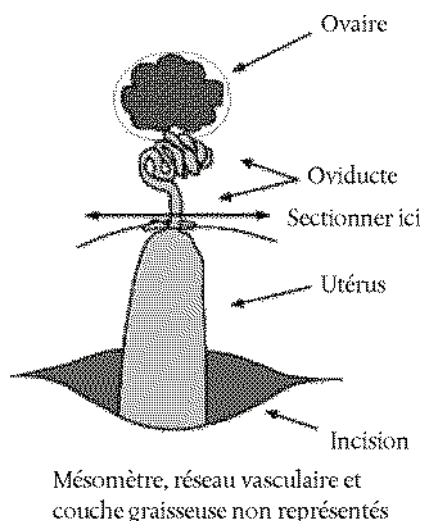
ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS

54. En général, un essai évaluant le pouvoir œstrogénique doit être considéré comme positif si l'on constate une augmentation statistiquement significative du poids utérin ($p < 0,05$) au moins chez le groupe traité avec la dose la plus élevée par rapport au groupe témoin qui a reçu le solvant. Un résultat positif est confirmé par la démonstration d'une relation biologiquement plausible entre la dose et l'ampleur de l'effet produit, sans perdre de vue que les effets œstrogéniques et antiœstrogéniques conjugués de la substance d'essai peuvent modifier la forme de la courbe dose-effet.
55. Il importe de veiller à ne pas dépasser la dose maximale tolérée pour pouvoir interpréter avec profit les données. La réduction du poids corporel, les signes cliniques et les autres données observées devront être soigneusement évalués à cet effet.
56. Il est important, pour pouvoir accepter les données du bioessai utéro-trophique, de considérer les poids utérins des animaux du groupe témoin qui a reçu le véhicule. Des valeurs témoins élevées peuvent compromettre la réactivité du bioessai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogènes de faible puissance. L'étude des données issues de la littérature et des données obtenues lors de la validation du bioessai utéro-trophique semblent montrer que les moyennes de référence peuvent être élevées spontanément, en particulier chez les animaux immatures (2) (3) (6) (9). Le poids utérin des rates immatures dépend de nombreuses variables, notamment de la souche ou du poids corporel, c'est pourquoi aucune limite supérieure précise ne peut être indiquée pour le poids utérin. À titre indicatif, si le poids des utérus séchés des rates immatures du groupe témoin est compris entre 40 et 45 mg, les résultats peuvent être considérés comme suspects et des poids utérins supérieurs à 45 mg peuvent nécessiter de refaire l'essai. Il conviendra cependant de procéder à une évaluation au cas par cas (3) (6) (8). Dans l'essai sur des rates adultes, toute ovariectomie incomplète peut laisser des tissus ovariens susceptibles de produire des œstrogènes endogènes et de retarder la régression du poids utérin.

▼ **M5**

57. Pour les groupes témoins qui ont reçu le véhicule, l'obtention d'utérus séchés de poids inférieurs à 0,09 % du poids corporel pour les rates immatures et à 0,04 % pour les jeunes adultes ovariectomisées semble donner des résultats acceptables [voir tableau 31 (2)]. Si les poids utérins de référence sont supérieurs à ces valeurs, plusieurs facteurs doivent être vérifiés, notamment l'âge des animaux, la qualité de l'ovariectomie, les phytoestrogènes présents dans l'alimentation, et tout résultat négatif (pas d'indication d'activité œstrogénique) devra être considéré avec prudence.
58. Les données historiques concernant les groupes témoins qui ont reçu le véhicule doivent être conservées dans le laboratoire. Les données historiques concernant les effets des œstrogènes témoins positifs, tels que le 17 α -éthynylestradiol, doivent aussi être conservées dans le laboratoire. Les laboratoires peuvent aussi tester les effets d'agonistes d'œstrogènes connus pour leur faible activité. Toutes ces données peuvent être comparées aux données dont on dispose (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) pour s'assurer que la sensibilité des méthodes du laboratoire est suffisante.
59. Lors de l'étude de validation de l'OCDE, la variabilité pondérale est apparue plus faible pour les utérus séchés que pour les utérus frais (6) (7). Toutefois, on considère qu'une réponse significative dans l'un ou l'autre cas indiquera que la substance d'essai est positive (activité œstrogénique).
60. La réponse utérotrrophique n'est pas uniquement d'origine œstrogénique mais, s'il s'avère positif, le bioessai utérotrrophique devra généralement être interprété comme preuve d'une activité œstrogénique potentielle *in vivo*, et devra normalement donner lieu à recherches plus poussées (voir le paragraphe 9 et le «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens», appendice 2).

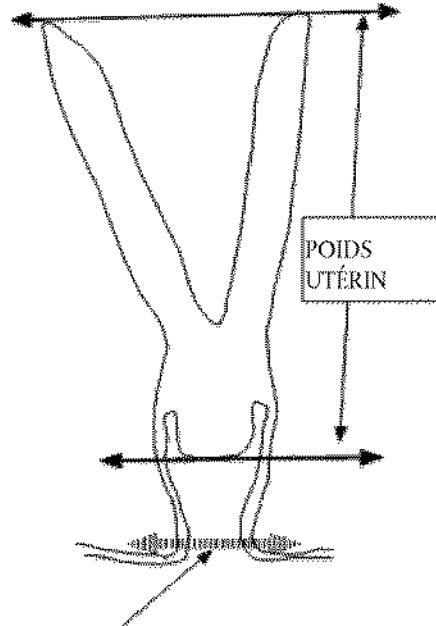
Figure 1

Schéma de l'ablation chirurgicale des ovaires

La procédure commence en ouvrant la paroi abdominale dorsolatérale au point médian entre la limite costale inférieure et la crête iliaque, et à quelques millimètres de la marge latérale du muscle lombaire. Les ovaires sont localisés dans la cavité abdominale. Sur un champ aseptique, on extrait les ovaires de la cavité abdominale, on pose une ligature entre l'ovaire et l'utérus pour arrêter le saignement, puis on détache l'ovaire par incision au-dessus de la ligature à la jonction de l'oviducte et de chaque corne utérine. Après avoir vérifié qu'aucun saignement important ne persiste, la paroi abdominale doit être recousue, et la peau refermée par des autoclips ou par suture, par exemple. On laisse ensuite les animaux se rétablir et le poids de l'utérus régesser pendant au moins 14 jours avant utilisation.

▼ **M5**

Figure 2

Prélèvement et préparation des tissus utérins avant pesée

Trait de section à la nécropsie

La procédure commence par l'ouverture de la paroi abdominale au niveau de la symphyse pubienne. On détache chaque ovaire, s'ils sont présents, et chaque corne utérine de la paroi abdominale dorsale. La vessie et les uretères sont dégagés de la face ventrale et latérale de l'utérus et du vagin. Les adhérences fibreuses entre le rectum et le vagin sont libérées jusqu'à ce qu'on repère la jonction de l'orifice vaginal et du périnée. L'utérus et le vagin sont détachés du corps par incision de la paroi vaginale juste au-dessus de la jonction du périnée comme indiqué sur la figure. L'utérus doit être détaché du corps en découpant soigneusement le mésentère à son point d'attache sur toute la longueur de la façade dorsolatérale de chaque corne utérine. Après prélèvement, on élimine la graisse excédentaire et le tissu conjonctif. S'ils sont présents, les ovaires sont détachés de l'oviducte en évitant l'écoulement de fluide luminal de la corne utérine. Si l'animal a été ovariectomisé, les cicatrices doivent être examinées pour repérer l'éventuelle présence de tissu ovarien. Le vagin est détaché de l'utérus à la base du col de l'utérus pour que celui-ci reste solidaire du corps utérin, comme l'indique la figure. L'utérus peut alors être pesé.

▼ **M5***Appendice 1*

DÉFINITIONS

Pouvoir antiœstrogénique: capacité d'une substance chimique à supprimer l'action de l'œstradiol-17 β chez les mammifères.

Date de naissance: jour 0 après la naissance.

Dosage: terme général recouvrant la dose, la fréquence d'administration et la durée d'administration.

Dose: quantité de substance d'essai administrée. Dans le bioessai utéroprolifératif, la dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience par jour (mg/kg de poids corporel/jour).

Dose maximale tolérée (DMT): quantité maximale d'une substance qui, lorsqu'elle est introduite dans le corps, n'est pas fatale aux animaux d'expérience (indiquée par la DL0) (UICPA, 1993)

Pouvoir œstrogénique: capacité d'une substance chimique à agir comme l'œstradiol-17 β chez les mammifères.

Jour X (après la naissance): Xe jour de vie après le jour de la naissance.

Sensibilité: proportion de toutes les substances positives/actives correctement classées par l'essai. Elle mesure l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriques et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Spécificité: proportion de toutes les substances négatives/inactives correctement classées par l'essai. Elle mesure l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriques et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Substance chimique: une substance ou un mélange

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Utéroprolifératif: terme utilisé pour décrire une influence positive sur la croissance des tissus utérins.

Validation: procédure scientifique destinée à caractériser les exigences et limitations opérationnelles d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et son applicabilité à une fin donnée.

Appendice 2

Note: Document préparé par le secrétariat du programme sur les lignes directrices à partir de l'accord conclu à la 6^e réunion du groupe d'étude sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA)

Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens

<p>Niveau 1 Tri et hiérarchisation des priorités en fonction des informations existantes</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- propriétés physiques et chimiques, par exemple poids moléculaire, réactivité, volatilité, biodégradabilité. --- exposition des êtres humains et de l'environnement, par exemple volume de production, rejet, modes d'utilisation) --- dangers, par exemple données toxicologiques disponibles 	
<p>Niveau 2 Essais in vitro livrant des données mécanistiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- affinité de liaison aux récepteurs des œstrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes. --- activation de la transcription --- genèse de l'aromatase et des stéroïdes in vitro --- reconnaissance/fixation sur le récepteur des hydrocarbures aromatiques --- relations quantitatives structure-activité (QSARs) --- dépistages préliminaires à haut débit --- fonction thyroïdienne --- essai sur la vitellogénine des hépatocytes de poisson --- autres, selon les besoins 	
<p>Niveau 3 Essais in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme et effet endocrinien</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- essai utérotrrophique (œstrogènes) --- essai de Hershberger (androgènes) --- fonctions hormonales non médiées par récepteurs --- autres (par exemple thyroïde) 	<ul style="list-style-type: none"> --- essai sur la vitellogénine du poisson (œstrogènes)
<p>Niveau 4 Essais in vivo livrant des données sur plusieurs mécanismes et effets endocriniens</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- LD 407 affinité [indicateurs (d'effets commandés par des mécanismes endocriniens)] --- essais de puberté chez les mâles et les femelles --- essai sur fœtus mâle intact 	<ul style="list-style-type: none"> --- essai histopathologique sur les gonades des poissons --- essai sur la métamorphose des grenouilles
<p>Niveau 5 Essais in vivo fournissant des données sur des effets mettant en jeu des mécanismes endocriniens et d'autres</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- étude de toxicité pour la reproduction sur une génération (LD 415 affiné)¹ --- étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations (LD 416 affiné)¹ --- essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (LD 423 affiné)¹ --- étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité (LD 422 affiné)¹ <p><small>¹ Les améliorations éventuelles seront examinées par le Groupe de gestion de la validation des essais sur les mammifères (VMG mammif).</small></p>	

Notes se rapportant au cadre conceptuel

▼ M5

NOTES SE RAPPORTANT AU CADRE CONCEPTUEL

- Note 1:* Il est possible d'entrer dans le cadre et d'en sortir à tous les niveaux, suivant la nature des informations nécessaires.
- Note 2:* Le niveau 5 relatif à l'écotoxicologie devrait inclure des indicateurs mettant en évidence le mode d'action des effets néfastes et d'éventuels dégâts au niveau des populations.
- Note 3:* S'il existe un modèle multimodal couvrant plusieurs des essais fournissant des données sur un seul indicateur, ce modèle doit remplacer ces essais.
- Note 4:* L'évaluation de chaque substance chimique est à effectuer au cas par cas, à la lumière de toutes les informations disponibles et compte tenu de la fonction des niveaux du cadre.
- Note 5:* La version actuelle du cadre ne doit pas être considérée comme exhaustive. Aux niveaux 3, 4 et 5, elle inclut des essais déjà disponibles ou en cours de validation. Ces derniers sont provisoirement inclus; ils seront confirmés une fois mis au point et validés.
- Note 6:* La portée des essais du niveau 5 n'est pas strictement limitée. Les essais incorporés à ce niveau servent à l'évaluation des dangers et des risques.

▼ **M5****BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (1998), Rapport de la première réunion du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA), 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OCDE (2003), Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: résumé de la documentation disponible à l'appui du projet du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA) en vue de normaliser et valider le bio-essai utéro-trophique, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 38, ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens, J.W., et Ashby, J. (2002), Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent, *Crit. Rev. Toxicol.*, 32:445-520.
- (4) OCDE (2006), OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 65, ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., et Owens, W. (2001), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1, *Environ Health Perspect.*, 109:785-94.
- (6) OCDE (2006), OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 66, ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., et Owens, W. (2003), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549
- (8) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., et Owens, W. (2003), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (9) Owens, W., Ashby, J., Odum, J., et Onyon, L. (2003), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses, *Environ. Health Persp.*, 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara, Y., Okamoto, S., Kitamura, Y., Matsumoto, K. (1983), Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine, *Endocrinology*, 113:582-587.
- (11) Branham, W.S., Sheehan, D.M., Zehr, D.R., Ridlon, E., et Nelson, C.J. (1985), The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-oestradiol, *Endocrinology*, 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf, M., Berger, L., Cotton, B., Conscience-Egli, M., Durrer, S., Fleischmann, I., Haller, V., Maerker, K., et Lichtensteiger, W. (2001), Estrogen active UV screens, *SÖFW-J*, 127:10-15.
- (13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., et Shoger, R.L. (1953), Estrogenic activity in a commercial animal ration, *Science*, 118:650-651.
- (14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., et Saba, N. (1975), The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., et Makela, S. (1998), A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens, *Environ. Health Perspec.*, 106:369-373.

▼ M5

- (16) OCDE (2007), Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 67.
- (17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., et Bolt, H.M. (2002), Estrogenic isoflavones in rodent diets, *Toxicol. Lett.*, 128:145-157.
- (18) Wade, M.G., Lee, A., McMahon, A., Cooke, G., et Curran, I. (2003), The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats, *Food Chem. Toxicol.*, 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Wada, T., Hara, T., et Takatsuki, M. (2002), Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or anti-estrogen, *Arch. Toxicol.*, 76:613-620.
- (20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., et Forsythe, D. (2003), Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice, *Comp. Med.*, 53:477-485.
- (21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., et Boyle, C.C. (2000), Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development, *J. Appl. Toxicol.*, 20:343-347.
- (22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Haseman, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., et Forsythe, D.B. (2002), Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays, *Cancer Detect. Prev.*, 26:381-393.
- (23) Thigpen, J.E., Li, L.-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., et Jameson, C.W. (1987), The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay, *Lab. Anim. Sci.*, 37:596-601.
- (24) OCDE (2008), Toxicité aiguë par voie orale: méthode de l'ajustement des doses, ligne directrice n° 425 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.
- (25) OCDE (2000), Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OCDE (2001), Guidance document on acute oral toxicity, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 24, ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., et Burn, J.H. (1935), The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution, *J. Physiol.*, 85: 320-333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F., et Koch, F.C. (1936), The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis, *Endocrinology*, 19: 33-41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C., et Neal, B.H. (1996), Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 34: 288-305.
- (30) Jones, R.C., et Edgren, R.A. (1973), The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat, *Fertil. Steril.*, 24: 284-291.
- (31) OCDE (1982), Organisation de coopération et de développement économiques — Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman, R.I. (1962), *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization, New York, Academic Press.
- (33) Thigpen, J.E. e.a. (2004), Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies, *ILAR J* 45(4): 401-416.

▼ M5

- (34) Gray, L.E., et Ostby, J. (1998), Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism, *Toxicol Ind Health*, 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth, A.N., Bickoff, E.M., et Kohler, G.O. (1960), Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products, *Science*, 131:1807-1808.
- (36) Kato, H., Iwata, T., Katsu, Y., Watanabe, H., Ohta, Y., et Iguchi, T. (2004), Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay, *J. Agric Food Chem.*, 52, 14101414.
- (37) OCDE (2007), Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antiœstrogenicity, Series on Testing and Assessment, No. 71.
- (38) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

▼ **M5****B.55. BIOESSAI DE HERSHBERGER SUR LE RAT: ESSAI DE DEPISTAGE A COURT TERME DE PROPRIETES (ANTI)ANDROGENIQUES**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 441 (2009) de l'OCDE. L'OCDE a lancé, en 1998, une activité à caractère hautement prioritaire dans le but de réviser les lignes directrices existantes et d'en établir de nouvelles relatives au dépistage et à l'essai des substances susceptibles de perturber le système endocrinien (1). L'une des composantes de cette activité concernait le développement d'une ligne directrice pour le bioessai de Hershberger sur le rat. Après plusieurs décennies d'utilisation par l'industrie pharmaceutique, cet essai a été pour la première fois normalisé par un comité d'experts officiels en 1962 comme outil de dépistage de substances chimiques androgéniques (2). Entre 2001 et 2007, le bioessai de Hershberger sur le rat a fait l'objet d'un programme de validation approfondi, comprenant notamment la constitution d'un document d'examen détaillé (23), la compilation d'un article détaillé sur les méthodes (3), l'élaboration d'un guide de dissection (21) et la mise en œuvre d'études intra- et interlaboratoires poussées visant à démontrer la fiabilité et la reproductibilité du bioessai. Ces études de validation ont été menées à l'aide d'un androgène de référence fortement actif [propionate de testostérone (TP)], de deux androgènes synthétiques fortement actifs (acétate de trenbolone et méthyltestostérone), d'un produit pharmaceutique antiandrogénique fortement actif (flutamide), d'un inhibiteur fortement actif (finastéride) de la synthèse de l'androgène naturel (dihydrotestostérone-DHT), de plusieurs pesticides faiblement antiandrogéniques (linuron, vinclozoline, procymidone, p,p' DDE), d'un inhibiteur de 5 α -réductase fortement actif (finastéride) et de deux substances chimiques négatives connues (dinitrophénol et nonylphénol) (4) (5) (6) (7) (8). La présente méthode d'essai résulte de la longue expérience acquise par l'utilisation du bioessai et de l'expérience acquise au cours du programme de validation et des résultats obtenus.
2. Le bioessai de Hershberger est un essai de dépistage in vivo à court terme qui emploie des tissus accessoires de l'appareil reproducteur mâle. L'essai date des années 30 et il a été modifié dans les années 40 par l'inclusion de muscles de l'appareil reproducteur mâle qui répondent aux androgènes (2) (9-15). Au cours des années 60, plus de 700 androgènes putatifs ont été évalués à l'aide d'une version normalisée du mode opératoire (2) (14), et l'utilisation de l'essai a été considérée comme une méthode standard aussi bien pour les androgènes que pour les antiandrogènes pendant les années 60 (2) (15). L'essai biologique actuel est fondé sur les variations de poids de cinq tissus dépendant des androgènes chez le rat mâle péripubertaire castré. Il évalue la capacité d'une substance chimique à induire des activités biologiques analogues à celles induites par des agonistes et des antagonistes d'androgènes ou des inhibiteurs de 5 α -réductase. Les cinq tissus cibles dépendant des androgènes inclus dans la présente méthode d'essai sont la prostate ventrale (PV), la vésicule séminale (VS) (plus les fluides et les glandes coagulantes), les muscles élévateurs de l'anus et bulbocaverneux (EABC), la paire de glandes de Cowper (COW) et le gland (G). Chez le rat mâle péripubertaire castré, ces cinq tissus répondent tous aux androgènes par une augmentation du poids absolu. Lorsqu'ils sont stimulés en vue d'augmenter leur poids par l'administration d'un androgène de référence fortement actif, ces cinq tissus répondent tous aux antiandrogènes par une diminution du poids absolu. Le premier modèle du bioessai de Hershberger est le mâle péripubertaire chirurgicalement castré, et il a été validé dans les phases 1, 2 et 3 du programme de validation de Hershberger.
3. Le bioessai de Hershberger est utilisé comme un test de dépistage mécanistique in vivo des agonistes d'androgènes, des antagonistes d'androgènes et des inhibiteurs de 5 α -réductase, et son application est envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens» (appendice 2). Dans ce cadre conceptuel, le

▼ M5

bioessai de Hershberger se situe au niveau 3 en tant qu'essai in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir l'(anti)androgénicité. Il est destiné à faire partie d'une batterie d'essais in vitro et in vivo permettant d'identifier les substances chimiques susceptibles d'interagir avec le système endocrinien et, à terme, d'évaluer les risques et les dangers pour la santé humaine ou l'environnement.

4. Compte tenu des problèmes de bien-être des animaux posés par la castration, le mâle sevré stimulé intact (non castré) a été étudié comme modèle alternatif pour l'essai Hershberger afin d'éviter l'étape de castration. La méthode d'essai utilisant le mâle sevré stimulé a été validée (24). Cependant, dans les études de validation, le modèle adulte sevré de l'essai Hershberger n'a pas montré sa capacité à détecter de façon régulière les effets de substances à faible activité antiandrogène sur le poids d'organes dépendant des androgènes, aux doses testées. C'est la raison pour laquelle ce modèle n'a pas été inclus dans la présente méthode d'essai. Toutefois, considérant que son utilisation peut avoir non seulement des avantages en termes de bien-être des animaux, mais peut aussi fournir des informations sur d'autres modes d'action, il est disponible dans le document d'orientation n° 115 de l'OCDE (25).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

5. Les agonistes et les antagonistes d'androgènes agissent comme des ligands du récepteur d'androgène et peuvent activer ou inhiber, respectivement, la transcription des gènes contrôlée par le récepteur. De surcroît, certaines substances chimiques inhibent la conversion de la testostérone en androgène dihydrotestostérone naturel plus actif dans certains tissus cibles des androgènes (inhibiteurs de 5 α -réductase). Ces substances peuvent avoir des effets néfastes pour la santé, y compris des effets sur la reproduction et le développement. Par conséquent, il est nécessaire, dans des objectifs de réglementation, d'estimer et d'évaluer rapidement les potentialités d'agoniste ou d'antagoniste des androgènes ou d'inhibiteur de 5 α -réductase d'une substance chimique. Même si leur valeur informative est appréciable, l'affinité d'un ligand pour un récepteur d'androgène telle que mesurée par sa liaison au récepteur ou par l'activation de la transcription de gènes reporters in vitro n'est pas le seul déterminant d'un danger éventuel. D'autres facteurs critiques sont l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution des substances entre les tissus cibles et l'élimination de l'organisme. Il est par conséquent nécessaire de détecter l'activité éventuelle d'une substance chimique in vivo dans des conditions opératoires et d'exposition appropriées. L'évaluation in vivo est moins cruciale si les caractéristiques ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination) de la substance chimique sont connues. Les tissus dépendant des androgènes répondent par une croissance rapide et vigoureuse à une stimulation par des androgènes, notamment chez les rats mâles péripubertaires castrés. Les rongeurs, en particulier le rat, sont aussi largement utilisés dans les études de toxicité visant à caractériser les dangers. Par conséquent, la version de l'essai qui emploie le rat péripubertaire castré et les cinq tissus cibles convient au dépistage in vivo d'agonistes et d'antagonistes des androgènes et d'inhibiteurs de 5 α -réductase.
6. La présente méthode d'essai est fondée sur les protocoles employés dans l'étude de validation de l'OCDE qui se sont révélés fiables et reproductibles dans les analyses intra- et interlaboratoires (4) (5) (6) (7) (8). Dans cette méthode d'essai sont présentés des protocoles pour les androgènes et pour les antiandrogènes.
7. La dose de TP utilisée pour détecter les antiandrogènes dans le programme de validation du bioessai de Hershberger de l'OCDE variait légèrement selon les différents laboratoires (0,2 versus 0,4 mg/kg/j par injection sous-cutanée), mais la capacité à détecter une activité antiandrogénique faible ou forte présentait peu de différence entre ces deux variantes du mode opératoire. De toute évidence, il ne faut pas utiliser une dose de TP trop élevée qui bloquerait les effets des antagonistes de récepteurs d'androgènes (RA) faibles, ni une dose trop faible, car les tissus androgéniques ne présenteraient alors qu'une réponse de croissance limitée même sans coadministration d'antiandrogène.

▼ M5

8. La réponse de croissance des tissus dépendant des androgènes individuels n'est pas entièrement d'origine androgénique, des substances qui ne sont pas des agonistes d'androgènes pouvant modifier le poids de certains tissus. Toutefois, la réponse de croissance simultanée de plusieurs tissus corrobore l'hypothèse d'un mécanisme plus spécifique des androgènes. Par exemple, des doses élevées d'oestrogènes fortement actifs peuvent augmenter le poids des vésicules séminales; cependant, les autres tissus dépendant des androgènes de l'essai ne répondront pas de manière similaire. Les substances chimiques antiandrogéniques peuvent agir comme des antagonistes des récepteurs d'androgènes ou des inhibiteurs de 5 α -réductase. L'effet des inhibiteurs de 5 α -réductase est variable, car la conversion en dihydrotestostérone plus active varie selon les tissus. Les antiandrogènes qui inhibent la 5 α -réductase, comme le finastéride, ont des effets plus marqués dans la prostate ventrale que dans les autres tissus lorsqu'on les compare à un antagoniste de RA fortement actif comme le flutamide. Cette différence de réponse en fonction des tissus peut être utilisée pour distinguer les modes d'action médiés par les RA de ceux médiés par la 5 α -réductase. De surcroît, le récepteur d'androgène est apparenté en termes d'évolution à celui d'autres hormones stéroïdiennes, et certaines autres hormones, administrées à des doses élevées supraphysiologiques peuvent lier le TP et jouer un rôle d'antagoniste de ses effets d'activation de la croissance (13). De plus, il est également plausible qu'un métabolisme stéroïdien activé et un abaissement corollaire de la teneur sérique en testostérone puissent réduire la croissance des tissus dépendant des androgènes. Par conséquent, tout résultat positif dans le bioessai de Hershberger est normalement évalué par une approche par éléments de preuve qui comprend des essais in vitro, tels que les essais de liaison aux RA et aux récepteurs oestrogéniques (RE) et des essais d'activation de la transcription correspondants, ou d'autres essais in vivo qui analysent des tissus cibles des androgènes similaires, tels que l'essai sur mâle pubère, l'essai sur mâle adulte intact de 15 jours ou les essais à doses répétées pendant 28 jours ou 90 jours.

9. L'expérience montre que les androgènes xénobiotiques sont plus rares que les antiandrogènes xénobiotiques. On s'attend par conséquent à utiliser plus souvent le bioessai de Hershberger pour le dépistage d'antiandrogènes. Toutefois, le mode opératoire d'essai d'androgènes est parfois recommandé pour des substances chimiques stéroïdiennes ou analogues aux stéroïdes ou pour des substances chimiques pour lesquelles des méthodes intégrées au niveau 1 ou 2 du Cadre conceptuel (appendice 2) ont fourni une indication d'éventuels effets androgéniques. De la même manière, des effets indésirables associés à des profils (anti)androgéniques peuvent être observés dans des essais de niveau 5 et nécessiter une évaluation visant à déterminer si une substance agit par un mode d'action endocrine.

10. Il est admis que tous les protocoles faisant appel à des animaux respectent les normes locales en matière de bien-être animal; les descriptifs des soins et traitements figurant ci-après constituent donc des normes minimales auxquelles se substitueront les réglementations locales telles que la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (26). D'autres recommandations relatives au traitement humain des animaux ont été formulées par l'OCDE (17).

11. Comme c'est le cas de tous les essais biologiques sur animaux expérimentaux, il conviendra d'évaluer soigneusement la nécessité d'une mise en œuvre de cette étude. Fondamentalement, deux raisons peuvent justifier une telle décision:
 - risque d'exposition élevé (niveau 1 du Cadre conceptuel) ou indications d'une (anti)androgénicité dans des essais in vitro (niveau 2) incitant à mener des études en vue de déterminer si ces effets pourraient s'exercer in vivo,
 - effets de nature (anti)androgénique dans des essais in vivo de niveau 4 ou 5 justifiant la mise en œuvre d'études sur le mode d'action spécifique, par exemple afin de déterminer si les effets sont dus à un mécanisme (anti)androgénique.

▼ **M5**

12. La définition des termes utilisés dans la présente méthode d'essai figure à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La sensibilité du bioessai de Hershberger est due à l'utilisation de mâles chez lesquels la production d'androgènes endogènes est minimale. En effet, les mâles sont castrés et la castration est suivie d'un délai adéquat permettant la régression des tissus cibles jusqu'à un poids de base minimal et uniforme. Ainsi, lors de la détection d'une activité androgénique potentielle, les teneurs endogènes en androgènes en circulation sont faibles, l'axe hypothalamique-pituitaire-gonadal est incapable de les compenser par des mécanismes de rétroaction, la capacité des tissus à répondre est maximale, et la variabilité du poids initial des tissus est minimale. Lors de la détection d'une activité antiandrogénique potentielle, il est possible d'obtenir un gain pondéral des tissus plus substantiel lorsque ceux-ci sont stimulés par un androgène de référence. Par conséquent, dans le bioessai de Hershberger, il ne faut que 6 animaux par groupe de dose alors que, dans d'autres essais qui emploient des mâles pubères ou adultes, l'utilisation de 15 mâles par groupe de dose est conseillée.
14. La castration des rats mâles péripubertaires est réalisée de manière appropriée à l'aide d'anesthésiques et d'une technique aseptique approuvés. Des analgésiques sont administrés durant les quelques jours qui suivent l'intervention chirurgicale afin d'éliminer la gêne postchirurgicale. La castration améliore la précision avec laquelle l'essai détecte les androgènes et les antiandrogènes faibles en supprimant les mécanismes de rétroaction endocrines compensatoires qui existent chez l'animal intact et peuvent atténuer les effets des androgènes et des antiandrogènes administrés, et élimine la large variabilité interindividus des teneurs sériques en testostérone. Par conséquent, la castration réduit les nombres d'animaux requis pour le dépistage de ces activités endocrines.
15. Pour détecter une activité androgénique potentielle, la substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée (sc) pendant une période de 10 jours consécutifs. Les substances d'essai sont administrées à au moins deux groupes de traitement d'animaux expérimentaux en utilisant un niveau de dose par groupe. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Une augmentation de poids statistiquement significative de deux des organes cibles ou plus dans les groupes recevant la substance d'essai comparés aux groupes témoin recevant le véhicule indique un résultat positif pour la substance d'essai relativement à l'activité androgénique potentielle (voir paragraphe 60). Les androgènes comme la trenbolone, qui ne peuvent être réduits en 5 α , présentent des effets sur l'EABC et le gland plus prononcés que ceux du TP, mais tous les tissus doivent présenter une augmentation de la croissance.
16. Pour détecter une activité antiandrogénique potentielle, la substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée pendant une période de 10 jours consécutifs simultanément à des doses quotidiennes de TP (0,2 ou 0,4 mg/kg/j) administrées par injection sous-cutanée. Le programme de validation a montré que les doses de 0,2 ou 0,4 mg/kg/j de TP permettaient toutes deux la détection d'antiandrogènes et, par conséquent, il convient de choisir l'une des doses à utiliser dans l'essai. Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées à au moins 3 groupes d'animaux expérimentaux traités, à raison d'un niveau de dose par groupe. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Une diminution statistiquement significative, par rapport aux groupes témoins ne recevant que du TP, du poids de deux organes cibles ou davantage dans les groupes de substance d'essai plus TP indique un résultat positif pour la substance d'essai en termes d'activité antiandrogénique potentielle (voir paragraphe 61).

▼ M5

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce et de la souche

17. Le rat est utilisé en routine dans le bioessai de Hershberger depuis les années 30. Sur le plan biologique, il est plausible que le rat et la souris présentent des réponses similaires, mais les 70 ans d'expérience avec le modèle de rat en font l'espèce de choix pour le bioessai de Hershberger. De surcroît, les données issues du bioessai pouvant servir de résultats préliminaires à une étude multigénérationnelle à long terme, il est ainsi possible d'utiliser dans les deux études des animaux de la même espèce, de la même souche et de la même source.

18. Ce mode opératoire remet aux laboratoires le soin de sélectionner la souche de rat à utiliser dans l'essai, qui sera en général celle habituellement employée dans le laboratoire concerné. On peut choisir les souches de rats de laboratoire couramment utilisées; toutefois, il faut éviter les souches dont la maturation est significativement plus longue que 42 jours, car une castration des mâles à 42 jours peut empêcher la mesure des poids de gland, qui ne peut être effectuée qu'après séparation du prépuce de la tige pénienne. Ainsi, on n'utilisera pas de souches dérivées du rat Fisher 344, sauf dans de rares cas. La chronologie du développement sexuel du rat Fisher 344 est différente de celle des autres souches couramment utilisées, telles que les souches Sprague Dawley ou Wistar (16). Dans le cas où une telle souche est utilisée, il conviendra de castrer les individus au laboratoire à un âge légèrement postérieur et il faudra démontrer la sensibilité de la souche utilisée. La justification du choix d'une souche de rat est clairement établie par le laboratoire. Si l'essai de dépistage est préalable à une étude par voie orale à doses répétées, à une étude sur la reproduction et le développement ou à une étude à long terme, il conviendra d'utiliser de préférence des animaux issus de la même souche et de la même source dans toutes les études.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

19. Tous les modes opératoires respectent l'ensemble des normes locales en vigueur sur le soin des animaux de laboratoire. Les conditions d'entretien et de traitement décrites ici sont des normes minimales auxquelles se substituent des réglementations locales plus contraignantes, telles que la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (26). La température du local expérimental est de 22 °C (à environ ± 3 °C). Le taux d'humidité relative est d'au moins 30 % et, de préférence, inférieur à 70 % en dehors des heures de nettoyage du local. On s'efforcera de maintenir l'humidité relative entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel. La séquence d'éclairage est de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

20. Il est préférable de loger les animaux en groupes plutôt que de les isoler, en raison de leur jeune âge et parce que les rats sont des animaux sociaux. Le logement de deux ou trois animaux par cage évite la concentration et le stress qui lui est associé, susceptible d'interférer avec le contrôle hormonal du développement du tissu sexuel accessoire. Les cages seront soigneusement nettoyées afin d'en éliminer tous les contaminants possibles et placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Le choix de cages de taille appropriée (~2 000 centimètres carrés) évitera le surpeuplement.

21. Chaque animal est identifié individuellement (par exemple par une marque ou une étiquette à l'oreille) en utilisant une méthode éthiquement acceptable. La méthode d'identification est consignée.

▼ **M5**

22. Les animaux recevront de la nourriture et de l'eau potable à volonté. Les laboratoires qui mettent en œuvre le bioessai de Hershberger utilisent le régime alimentaire du laboratoire qui est normalement utilisé dans les études d'essais sur les produits chimiques. Lors des études de validation du bioessai, aucun effet ni variabilité attribuable au régime alimentaire n'a été observé. Le régime utilisé sera indiqué et un échantillon en sera conservé à des fins d'éventuelle analyse future.

Critères de performance relatifs aux poids des organes dépendant des androgènes

23. Au cours de l'étude de validation, aucune donnée n'a permis de démontrer qu'une diminution du poids corporel affectait les augmentations ou les réductions de croissance de poids des tissus cibles (c'est-à-dire des tissus qui doivent être pesés).
24. Les poids des organes dépendant des androgènes des différentes souches de rats utilisées avec succès dans le programme de validation sont plus élevés chez les souches de rats les plus lourdes que chez les souches plus légères. Par conséquent, les critères de performance du bioessai de Hershberger n'incluent pas les poids absolus prévisibles des organes pour les témoins positifs et négatifs.
25. Le coefficient de variation (CV) d'un tissu étant inversement proportionnel à la puissance statistique, les critères de performance du bioessai de Hershberger sont fondés sur des valeurs de CV maximales pour chaque tissu (tableau 1). Les CV sont tirés des études de validation de l'OCDE. Dans le cas de résultats négatifs, les laboratoires examinent les CV du groupe témoin et du groupe de traitement à dose élevée afin de déterminer si les critères de performance de CV maximal ont été dépassés.
26. L'étude est répétée dans les cas suivants: 1) trois ou plus des dix CV individuels possibles dans les groupes témoin et de traitement à dose élevée dépassent les valeurs maximales indiquées pour les études d'agonistes et d'antagonistes dans le tableau 1 et 2) au moins deux des tissus cibles sont marginalement non significatifs, c'est-à-dire présentent des valeurs p comprises entre 0,05 et 0,10.

Tableau 1

CV maximaux autorisés déterminés pour les tissus sexuels accessoires cibles dans le modèle sur rat castré dans les études de validation de l'OCDE ⁽¹⁾

Tissu	Effets antiandrogéniques	Effets androgéniques
Vésicules séminales	40 %	40 %
Prostate ventrale	40 %	45 %
EABC	20 %	30 %
Glandes de Cowper	35 %	55 %
Gland	17 %	22 %

⁽¹⁾ Le CV limite pour un tissu donné a été identifié à partir d'un graphe de valeurs de CV — reportées successivement de la plus petite à la plus grande — pour toutes les moyennes de toutes les expériences de l'étude de validation en utilisant un modèle spécifique (agoniste ou antagoniste). Le CV limite est lu au point auquel les incréments entre les CV les plus élevés suivants de la série sont largement plus grands que ceux qui séparent les quelques CV précédents, ou «point de rupture». Il convient de noter que même si cette analyse a identifié des «points de rupture» relativement fiables pour le modèle des antagonistes de l'essai, les courbes de CV pour l'essai des agonistes présentaient une augmentation plus uniforme et l'identification d'un CV limite par cette méthode est donc quelque peu arbitraire.

▼ M5**MODE OPÉRATOIRE****Respect de la réglementation et vérification au laboratoire**

27. Il est inutile de démontrer la compétence du laboratoire avant le début de l'étude pour l'essai de Hershberger comme c'est le cas pour l'essai utéro-trophique (chapitre B.54 de la présente annexe), car des témoins positifs (propionate de testostérone et flutamide) et négatifs sont simultanément inclus dans l'essai.

Nombre et répartition des animaux

28. Chaque groupe d'essai et témoin comprend au moins 6 animaux. Cela s'applique aux protocoles androgéniques et antiandrogéniques.

Castration

29. Une période d'acclimatation initiale de plusieurs jours après réception des animaux attestera que les sujets sont sains et performants. Des animaux castrés avant l'âge de 42 jours ou au 42^e jour postnatal (JPN) ne présentant pas toujours de séparation préputiale, il faut castrer les animaux au JPN 42 ou après, mais pas avant. Les animaux sont castrés sous anesthésie par incision dans le scrotum et prélèvement des testicules et de l'épididyme avec ligature des vaisseaux sanguins et des canalicules séminifères. Après confirmation de l'absence de saignement, le scrotum est refermé par des sutures ou des agrafes autoserrantes. Les animaux sont traités par des analgésiques pendant les quelques jours qui suivent l'intervention chirurgicale afin d'atténuer toute gêne postchirurgicale. Si les animaux sont acquis déjà castrés auprès d'un fournisseur d'animaux, celui-ci garantira leur âge et leur stade de maturité sexuelle.

Acclimatation après castration

30. Les animaux restent en acclimatation aux conditions de laboratoire pour permettre la régression des poids des tissus cibles pendant 7 jours au minimum après la castration. Ils sont observés quotidiennement, et tout animal présentant des signes de maladie ou d'anomalie physique est retiré. Ainsi, le début du traitement par administration des doses (à l'étude) peut commencer dès le 49^e JPN, mais jamais après le 60^e JPN. À l'autopsie, l'animal n'est pas âgé de plus de 70 JPN. Ce degré de flexibilité permet une programmation efficace du travail expérimental au laboratoire.

Poids corporel et randomisation des groupes

31. Les différences entre les poids corporels individuels représentent une source de variabilité entre les poids des tissus tant entre les groupes d'animaux qu'au sein de ces groupes. L'augmentation de la variabilité des poids des tissus se traduit par une augmentation du coefficient de variation (CV) et réduit la puissance statistique de l'essai (parfois aussi désignée par sensibilité de l'essai). Il convient par conséquent de limiter les variations du poids corporel au niveau expérimental ainsi qu'au niveau statistique.
32. Au niveau expérimental, il faut s'efforcer de réduire les variations de poids corporels au sein des groupes d'étude et entre eux. Tout d'abord, il convient d'écartier les animaux de taille anormalement grande ou petite et de ne pas les intégrer dans la cohorte de l'étude. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne dépassent pas $\pm 20\%$ du poids moyen (par exemple $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ pour les rats péripubertaires castrés). En second lieu, il faut répartir les animaux au hasard dans les groupes (témoin et traités), de façon qu'il n'y ait aucune différence statistique de poids corporel moyen d'un groupe à l'autre. Le protocole de randomisation par blocs utilisé est consigné.

▼ M5

33. La toxicité étant susceptible de réduire le poids corporel dans les groupes traités par rapport à celui du groupe témoin, il faut utiliser comme covariable statistique le poids corporel au premier jour d'administration de la substance de l'essai et non le poids corporel à l'autopsie.

Posologie

34. Afin d'établir si une substance d'essai peut avoir une action androgénique in vivo, il suffit généralement d'utiliser 2 groupes de dose de la substance d'essai auxquels s'ajoutent des témoins positifs et de véhicule (négatif) (voir paragraphe 43), et cette posologie est par conséquent préférée pour des raisons de bien-être animal. Si l'objectif est d'obtenir une courbe de la relation dose-effet ou d'extrapoler les résultats à des doses plus faibles, au moins 3 groupes de dose seront nécessaires. Si l'on souhaite obtenir des informations plus détaillées que la simple identification d'une activité androgénique (estimation de la puissance, par exemple), un autre régime posologique devra être envisagé. Si l'on cherche à tester des antiandrogènes, la substance d'essai est administrée en combinaison avec un agoniste d'androgène de référence. Il faut utiliser au moins 3 groupes d'essai avec différentes doses de la substance d'essai et un témoin positif et un témoin négatif (voir paragraphe 44). Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin devront subir exactement le même traitement que 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 dans les groupes d'essai.
35. Tous les niveaux de dose sont proposés et sélectionnés à la lumière des données existantes sur la toxicité et le comportement (toxico)-cinétique de la substance d'essai ou de substances connexes. Le niveau de dose le plus élevé est établi tout d'abord en fonction de la DL50 et/ou des informations sur la toxicité aiguë afin d'éviter le décès et la détresse ou la souffrance extrêmes des animaux (17) (18) (19) (20) et, en second lieu, il convient de tenir compte des informations disponibles sur les doses utilisées dans des études subchroniques et chroniques. En général, la dose la plus élevée ne provoque pas de réduction du poids corporel final des animaux supérieure à 10 % du poids témoin. La dose la plus élevée est la plus haute dose qui assure la survie de l'animal et qui n'induit pas de toxicité ni de détresse significative au bout de 10 jours consécutifs d'administration jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/jour (voir paragraphe 36), ou bien une dose inférieure induisant des effets (anti)androgéniques, quelle qu'elle soit. Pour un dépistage, de larges intervalles entre les doses sont acceptables, par exemple, une demi-unité logarithmique (soit un facteur de progression de 3,2) ou même une unité logarithmique. En l'absence de données appropriées, une étude préliminaire de détermination des doses (voir paragraphe 37) peut permettre de définir les doses qu'il convient d'utiliser.

Dose limite

36. Lorsque, dans un essai, la dose limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour et une dose inférieure dans le cadre des protocoles décrits par cette étude ne permettent pas de produire de changement statistiquement significatif des poids des organes reproducteurs, on peut considérer qu'il est inutile de tester d'autres niveaux de dose. Le concept de dose limite s'applique dans tous les cas, sauf lorsque des données d'exposition pour l'homme indiquent qu'il est nécessaire d'utiliser un niveau de dose plus élevé.

Détermination des doses

37. Le cas échéant, une étude préliminaire de détermination des doses peut être effectuée sur un petit nombre d'animaux afin de définir les groupes d'essai appropriés [par recours aux méthodes d'essai de la toxicité aiguë (chapitres B.1 bis, B.1 ter de la présente annexe (27), ligne directrice 425 de l'OCDE (19)]. L'objectif, dans le cas du bioessai de Hershberger, est de choisir des doses qui assurent la survie des animaux et n'entraînent pas de détresse ni

▼ M5

d'effets toxiques graves après 10 jours consécutifs d'administration de la substance chimique, jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/j, comme il est indiqué dans les paragraphes 35 et 36. À cet égard, le document d'orientation de l'OCDE (17) qui définit les signes cliniques indicateurs de toxicité ou de détresse des animaux peut être utilisé. Lorsque cela est possible dans le cadre de cette étude préliminaire de détermination des doses, après 10 jours d'administration, les tissus cibles peuvent être excisés et pesés environ 24 heures après administration de la dernière dose. Ces données peuvent ensuite contribuer à la sélection des doses dans l'étude principale.

Substances chimiques de référence et véhicule

38. L'agoniste d'androgènes de référence est le propionate de testostérone (TP), n° CAS 57-82-5. La dose de TP de référence peut être égale à 0,2 mg/kg de poids corporel/j ou bien à 0,4 mg/kg de poids corporel/j. L'antagoniste d'androgènes de référence est le flutamide (FT), n° CAS 1311-84-7. La dose de FT de référence est égale à 3 mg/kg de poids corporel/j et le FT est coadministré avec la dose de TP de référence.

39. Il est recommandé d'envisager d'utiliser, dans la mesure du possible, une solution ou une suspension aqueuse pour commencer. Toutefois, de nombreux ligands d'androgènes ou leurs précurseurs métaboliques sont plutôt hydrophobes, c'est pourquoi on utilise le plus souvent une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple huile de maïs, d'arachide, de sésame ou d'olive). Les substances d'essai peuvent être dissoutes dans une quantité minimale d'éthanol à 95 % ou d'autres solvants appropriés, puis diluées dans le véhicule de l'essai aux concentrations finales de l'étude. Les caractéristiques toxiques du solvant sont connues et évaluées sur un groupe témoin séparé traité uniquement avec le solvant. Si la substance d'essai est considérée comme stable, on peut légèrement chauffer le mélange et le soumettre à une action mécanique vigoureuse pour faciliter sa dissolution. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule est déterminée. Si la substance d'essai est stable pendant toute la durée de l'étude, une fraction aliquote initiale de la substance d'essai peut être préparée, puis les dilutions spécifiées sont réalisées quotidiennement en prenant soin d'éviter la contamination et la détérioration des échantillons.

Administration des doses

40. Le TP est administré par injection sous-cutanée, et le FT par gavage oral.

41. La substance d'essai est administrée par gavage oral ou injection sous-cutanée. Il faut tenir compte du bien-être des animaux et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai lors du choix de la voie d'administration. De surcroît, il convient de considérer les aspects toxicologiques comme l'adéquation à la voie d'exposition de l'homme à la substance chimique (gavage oral pour représenter une exposition par ingestion, injection sous-cutanée pour une exposition par inhalation ou adsorption cutanée), les informations toxicologiques existantes et les données sur le métabolisme et la cinétique (par exemple la nécessité d'éviter le métabolisme de premier passage, meilleure efficacité d'une des voies d'administration), avant de mettre en œuvre un essai approfondi à long terme lorsque des résultats positifs sont obtenus par injection.

42. Il faut administrer les doses aux animaux de la même manière et avec la même séquence temporelle pendant 10 jours consécutifs à des intervalles d'environ 24 heures. Le niveau de dose est ajusté tous les jours en se fondant sur les mesures quotidiennes simultanées de poids corporel. Le volume de dose et le moment auquel elle est administrée sont notés chaque jour d'exposition. Il importe de veiller à ne pas dépasser la dose maximale mentionnée au paragraphe 35 pour pouvoir interpréter avec profit les données. La réduction du poids corporel, les signes cliniques et les autres données observées devront être soigneusement évalués dans cette perspective. Dans le cas d'un gavage oral, il faut utiliser une sonde gastrique

▼ M5

ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal expérimental. Les directives locales de soins aux animaux sont observées, mais le volume n'excède pas 5 ml/kg de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas d'injections sous-cutanées, les doses sont injectées dans la région dorso-scapulaire ou lombaire à l'aide d'une aiguille stérile (de calibre 23 ou 25) et d'une seringue de tuberculination. Le rasage du site d'injection est facultatif. Toute perte ou fuite au site de l'injection ou toute administration incomplète sont consignées. Le volume total injecté par rat par jour ne dépasse pas 0,5 ml/kg de poids corporel.

Mode opératoire spécifique pour les agonistes d'androgènes

43. Dans les essais d'agonistes d'androgènes, le véhicule est le témoin négatif et le groupe traité par TP est le témoin positif. L'activité biologique correspondant aux agonistes d'androgènes est testée par administration d'une substance d'essai à des groupes de traitement aux doses choisies pendant 10 jours consécutifs. Les poids des cinq tissus sexuels accessoires des groupes recevant la substance d'essai sont comparés à ceux du groupe recevant le véhicule afin de déterminer des augmentations pondérales statistiquement significatives.

Modes opératoires spécifiques pour les antagonistes d'androgènes et les inhibiteurs de 5 α -réductase

44. En ce qui concerne les essais d'antagonistes d'androgènes et d'inhibiteurs de 5 α -réductase, le groupe traité par TP joue le rôle de témoin négatif et le groupe recevant des doses de référence de TP et de FT coadministrées celui de témoin positif. L'activité biologique correspondant aux antagonistes d'androgènes et aux inhibiteurs de 5 α -réductase est analysée par administration d'une dose de référence de TP et administration de la substance d'essai pendant 10 jours consécutifs. Les poids des cinq tissus sexuels accessoires des groupes recevant du TP plus la substance d'essai sont comparés à ceux du groupe ne recevant que TP de référence afin de déterminer des diminutions des poids statistiquement significatives.

OBSERVATIONS**Observations cliniques**

45. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour et plus fréquemment si des signes de toxicité sont constatés. Il faut les conduire de préférence chaque jour à la (aux) même(s) heure(s) et en tenant compte des prévisions des maxima d'effets après l'administration des doses. La mortalité, la morbidité et les signes cliniques généraux tels que les changements de comportement, les modifications de la peau, du pelage, des yeux et des muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et les activités végétatives (larmolement, piloérection, taille des pupilles, respiration inhabituelle, par exemple) sont détectées sur tous les animaux.
46. Tous les animaux décédés sont retirés et éliminés sans autre analyse de résultat. La mortalité des animaux avant l'autopsie de quelque nature que ce soit est incluse dans le dossier de l'étude ainsi que toutes les raisons apparentes de mortalité. Tous les animaux moribonds sont humainement sacrifiés. Tous les animaux moribonds et sacrifiés par la suite sont inclus dans le dossier de l'étude avec les causes apparentes de morbidité.

▼ M5**Poids corporel et consommation alimentaire**

47. Tous les animaux sont pesés quotidiennement à 0,1 g près, en commençant juste avant le début du traitement c'est-à-dire au moment de la répartition des animaux dans les groupes. La quantité de nourriture consommée durant la période de traitement peut éventuellement être mesurée cage par cage en pesant les distributeurs d'aliments. Ces données sur la consommation alimentaire sont exprimées en grammes par rat par jour.

Dissection et mesure des poids des tissus et des organes

48. Environ 24 heures après la dernière administration de la substance d'essai, les rats sont sacrifiés et exsanguinés conformément aux protocoles habituels du laboratoire réalisant l'étude, puis l'autopsie est effectuée. La méthode humaine de sacrifice est consignée dans le rapport du laboratoire.

49. Dans l'idéal, l'ordre dans lequel les groupes d'animaux sont autopsiés est aléatoire et ne suit pas l'ordre de croissance ou de décroissance des doses, ce qui pourrait affecter les données. Toutes les observations effectuées lors de l'autopsie, notamment les modifications pathologiques et les lésions visibles sont notées et consignées.

50. Les cinq tissus dépendant des androgènes (PV, VS, EABC, COW, G) font l'objet de mesures. Ces tissus sont excisés, soigneusement débarrassés des tissus et des graisses adhérents en excès, et leurs poids frais (non fixé) est déterminé. Chaque tissu est manipulé avec un soin particulier afin d'éviter la perte de fluide et la dessiccation, susceptibles d'introduire des erreurs significatives et une variabilité par réduction des poids consignés. Certains tissus peuvent être très petits ou difficiles à disséquer, ce qui est source de variabilité. Par conséquent, il est important que les modes opératoires de dissection standard utilisés pour les tissus sexuels accessoires soient bien maîtrisés par les personnes chargées de cette tâche. Un manuel de modes opératoires normalisés pour la dissection est disponible auprès de l'OCDE (21). Une formation poussée basée sur le guide de modes opératoires normalisés limitera une source de variation potentielle dans l'étude. Dans l'idéal, le même prosecteur sera chargé de la dissection d'un tissu donné afin d'éliminer les différences de traitement des tissus propres aux individus. Si cette approche s'avère impossible, le programme d'autopsie est conçu de façon que chaque prosecteur dissèque un tissu donné de tous les groupes de traitement, et non pas tous les tissus d'un groupe témoin, tandis qu'un autre est responsable des groupes traités. Chaque tissu sexuel accessoire est pesé sans essuyage préalable à 0,1 mg près, et les poids sont notés pour chaque animal.

51. Certains tissus sont très petits ou difficiles à disséquer, ce qui est source de variabilité. Des études précédentes ont indiqué un intervalle de coefficients de variation (CV) qui se révèle différent selon les compétences du laboratoire. Dans quelques cas, de grandes différences entre les poids absolus de tissus tels que la PV et les COW ont été observées au sein d'un laboratoire particulier.

52. Les mesures de poids du foie, de la paire de reins et de la paire de glandes surrénales sont facultatives. Ces tissus sont également débarrassés de tous les fascias et graisses adhérents. Le foie est pesé et la mesure consignée à 0,1 g près et la paire de reins et la paire de glandes surrénales sont pesées et les mesures consignées à 0,1 mg près. Le foie, le rein et les glandes surrénales ne sont pas influencés uniquement par les androgènes; ils fournissent également des indices utiles sur la toxicité systémique.

▼ **M5**

53. La mesure des teneurs sériques en hormone lutéinisante (LH), en hormone folliculo-stimulante (FSH) et en testostérone (T) est facultative. Les teneurs sériques en testostérone sont utiles pour déterminer si la substance de l'essai induit un métabolisme hépatique de la testostérone, susceptible de réduire les teneurs sériques. Si l'on ne dispose pas des données concernant la testostérone, cet effet pourrait paraître imputable à un mécanisme antiandrogénique. Les teneurs en LH livrent des informations sur la capacité d'un antiandrogène à réduire les poids des organes, mais également sur son aptitude à affecter la fonction hypothalamique-pituitaire, qui, dans les études à long terme, peut induire des tumeurs des testicules. La FSH est une hormone importante pour la spermatogénèse. La mesure des teneurs sériques en T4 et T3 est également facultative et peut fournir des informations additionnelles utiles sur la capacité à rompre l'homéostasie de l'hormone thyroïdienne. En vue d'obtenir des mesures des teneurs en hormones, il faut anesthésier les rats avant l'autopsie et prélever du sang par ponction cardiaque, le procédé d'anesthésie étant choisi avec soin afin qu'il n'affecte pas la mesure des hormones. La méthode de préparation du sérum, la source des kits d'essai radio-immunologique ou d'autres techniques de mesure, les protocoles analytiques et les résultats sont consignés. Les teneurs en LH ainsi que les teneurs en testostérone sont notées en ng/ml de sérum.
54. La description de la dissection des tissus est basée sur un guide de dissection détaillé qui contient des photographies et est publié sous forme de supplément intégré au programme de validation (21). La page web de la Food and Drug Administration coréenne propose également une vidéo présentant la dissection (22).
- La surface ventrale de l'animal tournée vers le haut, déterminer si le prépuce du pénis s'est séparé du gland. Si c'est le cas, rétracter le prépuce et retirer le gland, le peser (à 0,1 mg près), et noter le poids.
 - Ouvrir la peau et la paroi abdominales, en exposant les viscères. S'il faut peser les organes facultatifs, prélever et peser le foie à 0,1 g près, prélever l'estomac et les intestins, prélever et peser à 0,1 mg près la paire de reins et la paire de glandes surrénales. Cette dissection expose la vessie et initie la dissection des tissus accessoires mâles cibles.
 - Afin de disséquer la PV, séparer la vessie de la couche musculaire ventrale en découpant le tissu conjonctif le long de la ligne médiane. Déplacer la vessie dans la direction antérieure vers les vésicules séminales (VS), en découvrant les lobes gauche et droit de la prostate ventrale (recouverts d'une couche de graisse). Gratter soigneusement la graisse des lobes droit et gauche de la PV. Écarter doucement le lobe droit de la PV de l'urètre et disséquer le lobe de l'urètre. Tout en maintenant toujours le lobe droit de la PV, écarter doucement le lobe gauche de la PV de l'urètre puis le disséquer; peser à 0,1 mg près et noter le poids.
 - Afin de disséquer la vésicule séminale plus les glandes coagulantes (VSGC), déplacer la vessie en direction caudale, exposer le canal déférent et les lobes droit et gauche des VSGC. Empêcher la fuite du fluide par clampage d'une pince hémostatique à la base des VSGC, au point où le canal déférent rejoint l'urètre. Disséquer soigneusement les VSGC, en maintenant la pince hémostatique en place, retirer la graisse et les annexes, les placer dans une coupelle de pesée tarée, retirer la pince hémostatique et peser à 0,1 mg près, puis noter le poids.

▼ **M5**

- Afin de disséquer les muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux (EABC), les muscles et la base du pénis sont exposés. Les muscles EA enveloppent le colon, tandis que les muscles EA antérieur et BC sont attachés aux bulbes péniens. La peau et les annexes de la région périnéale qui s'étendent de la base du pénis jusqu'à l'extrémité antérieure de l'anus sont retirés. Les muscles BC sont progressivement disséqués du bulbe pévien et des tissus. Le colon est coupé en deux, et la totalité de l'EABC peut être disséquée et retirée. L'EABC est débarassé des graisses et des annexes, pesé à 0,1 mg près, puis le poids est noté.
 - Après retrait de l'EABC, les glandes de Cowper ou bulbo-urétrales (COW) rondes sont visibles à la base des bulbes péniens et en position légèrement dorsale. Il est nécessaire de procéder à une dissection soigneuse pour éviter de couper la capsule mince et empêcher toute fuite de fluide. Peser la paire de COW à 0,1 mg près et noter le poids.
 - En outre, lorsque du fluide s'échappe d'une glande quelle qu'elle soit au cours de l'autopsie et de la dissection, cette perte est consignée.
55. Si l'évaluation de chaque substance chimique nécessite d'autopsier davantage d'animaux qu'il n'est raisonnable en un seul jour, le début de l'étude est échelonné sur 2 jours consécutifs, ce qui permettra d'échelonner l'autopsie et les tâches afférentes sur 2 jours. Dans ce type de répartition, il convient d'utiliser la moitié des animaux d'un groupe de traitement par jour.
56. Les carcasses sont éliminées d'une manière appropriée après l'autopsie

RAPPORT**Données**

57. Les données sont consignées individuellement (à savoir poids corporel, poids des tissus sexuels accessoires, mesures facultatives et autres réponses et observations) et pour chaque groupe d'animaux (les moyennes et écarts types de toutes les mesures sont relevés). Les résultats sont résumés sous forme de tableaux faisant apparaître le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou présentant des signes de toxicité, et une description de ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité.
58. Le rapport final contient les informations suivantes:

Établissement réalisant l'essai

- Nom de l'établissement, adresse
- Directeur de l'étude et autres membres du personnel ainsi que leur responsabilité dans l'étude
- Dates de début et de fin de l'étude, c'est-à-dire premier jour d'administration de la substance d'essai et dernier jour de l'autopsie, respectivement

Substance d'essai

- Source, numéro de lot, identité, pureté, adresse complète du fournisseur et caractérisation de la ou des substances d'essai
- Nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques
- Conditions de stockage et méthode et fréquence de préparation de la dilution
- Données obtenues sur la stabilité, quelles qu'elles soient
- Analyses des solutions/suspensions administrées, quelles qu'elles soient

▼ M5*Véhicule*

- Caractérisation du véhicule (identité, fournisseur et numéro de lot)
- Justification du choix du véhicule (s'il ne s'agit pas d'eau)

Animaux expérimentaux et protocoles d'élevage des animaux

- Espèce/souche utilisée et justification du choix
- Source ou fournisseur des animaux, comprenant l'adresse complète
- Nombre et âge des animaux fournis
- Conditions d'hébergement (température, éclairage, etc.)
- Régime alimentaire (nom, type, fournisseur, numéro de lot, contenu et si elles sont connues, teneurs en phytoestrogènes)
- Litière (nom, type, fournisseur, contenu)
- Conditions de logement en cage et nombre d'animaux par cage

Conditions de l'essai

- Âge à la castration et durée de l'acclimatation après castration
- Poids de chaque animal au début de l'étude (à 0,1 g près)
- Procédé de randomisation et répartition dans les groupes de véhicule, de référence, de substance d'essai, et dans les cages
- Moyenne et écart type des poids corporels dans chaque groupe chaque jour de pesée pendant toute l'étude
- Justification du choix des doses
- Voie d'administration de la substance d'essai et justification du choix de la voie d'exposition
- S'il s'agit d'un essai pour déterminer l'antiandrogénicité, traitement par TP (dose et volume)
- Traitement par la substance d'essai (dose et volume)
- Moment d'administration
- Modes opératoires d'autopsie, notamment moyens d'exsanguination et toutes les anesthésies
- Dans le cas d'analyses du sérum, les détails de la méthode sont consignés. Par exemple, si l'on utilise un RIA, le mode opératoire de RIA, la source des kits de RIA, les dates d'expiration des kits, le mode opératoire de comptage par scintillation et l'étalonnage sont consignés.

Résultats

- Observations quotidiennes de chaque animal pendant l'administration de la dose, notamment:
- Poids corporels (à 0,1 g près)
- Signes cliniques (le cas échéant)
- Mesures ou notes sur la consommation d'aliments
- Observations à l'autopsie de chaque animal, notamment:

▼ M5

- Date de l'autopsie
- Groupe de traitement de l'animal
- ID de l'animal
- Prosecteur
- Moments de la journée auxquels sont réalisées l'autopsie et la dissection
- Âge de l'animal
- Poids corporel final à l'autopsie, en notant toute augmentation ou diminution statistiquement significative
- Ordre d'exsanguination et de dissection des animaux à l'autopsie
- Poids des cinq tissus cibles dépendant des androgènes:
 - Prostate ventrale (à 0,1 mg près)
 - Vésicules séminales plus glandes coagulantes, y compris les fluides (par paires à 0,1 mg près)
 - Complexe des muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux (à 0,1 mg près)
 - Glandes de Cowper (poids frais, par paires, à 0,1 mg près)
 - Gland (poids frais à 0,1 mg près)
- Poids des tissus facultatifs, s'ils ont été mesurés:
 - Foie (à 0,1 mg près)
 - Reins (par paires à 0,1 mg près)
 - Glandes surrénales (par paires à 0,1 mg près)
- Remarques générales et commentaires
- Analyse des hormones sériques, le cas échéant
 - LH sérique (facultatif — ng/ml de sérum) et
 - T sérique (facultatif — ng/ml de sérum)
- Remarques générales et commentaires

Résumé des données

Les données sont résumées sous forme de tableaux contenant la taille de l'échantillon pour chaque groupe, la moyenne de la valeur, et l'erreur type de la moyenne ou l'écart type. Les tableaux comprennent les poids corporels à l'autopsie, les variations du poids corporel entre le début de l'administration de la substance et l'autopsie, les poids des tissus sexuels accessoires cibles et tous les poids d'organes facultatifs.

*Discussion des résultats***Analyse des résultats**

59. Les poids du corps et des organes à l'autopsie font l'objet d'une analyse statistique afin de déterminer des paramètres tels que l'homogénéité de la variance, à l'aide de transformations appropriées des données, selon les besoins. Les groupes de traitement sont comparés à un groupe témoin en utilisant des techniques telles que le test ANOVA, suivi de comparaisons par paires (par exemple test unilatéral de Dunnett) et les critères de différence statistique, par exemple $p \leq 0,05$. Les groupes présentant une signification statistique sont identifiés. Néanmoins, il faut éviter les poids d'organe relatifs, car les hypothèses statistiques qui fondent cette manipulation de données sont invalides.

▼ **M5**

60. En ce qui concerne l'agonisme des androgènes, le témoin est constitué du groupe d'essai recevant seulement le véhicule. Les caractéristiques du mode d'action d'une substance d'essai peuvent provoquer des réponses relatives différentes selon les tissus, par exemple, la trenbolone, qui ne peut être réduite en position 5α , exerce des effets plus prononcés sur l'EABC et le G que le TP. Une augmentation statistiquement significative ($p \leq 0,05$) de deux des cinq poids de tissus dépendant des androgènes cibles ou plus (VP, EABC, G, GC et VSGC) peut être considérée comme un résultat positif d'agoniste d'androgènes, et tous les tissus cibles doivent alors présenter un degré quelconque d'augmentation de croissance. L'évaluation combinée de toutes les réponses de tissus d'organes sexuels annexes peut être réalisée au moyen d'une analyse de données multivariées appropriée. L'analyse peut ainsi être affinée, en particulier dans les cas où un seul tissu donne une réponse statistiquement significative.
61. Pour étudier l'antagonisme des androgènes, le témoin est constitué du groupe d'essai avec l'androgène de référence (propionate de testostérone seulement). Les caractéristiques du mode d'action d'une substance d'essai peuvent aboutir à des réponses relatives différentes entre les tissus, par exemple les inhibiteurs de 5α -réductase, comme le finastéride, exercent des effets plus prononcés sur la prostate ventrale que sur d'autres tissus par rapport à des antagonistes de RA puissants, comme le flutamide. Une réduction statistiquement significative ($p \leq 0,05$) de deux des cinq poids de tissus dépendant des androgènes cibles ou plus (VP, EABC, G, GC et VSGC) par rapport au traitement par TP seul peut être considérée comme un résultat positif d'antagoniste d'androgènes, et tous les tissus cibles doivent alors présenter une réduction de croissance à un degré quelconque. L'évaluation combinée de toutes les réponses de tissus d'organes sexuels annexes peut être réalisée au moyen d'une analyse de données multivariées appropriée. L'analyse peut ainsi être affinée, en particulier dans les cas où un seul tissu donne une réponse statistiquement significative.
62. Les données seront résumées sous forme de tableaux contenant la moyenne, l'erreur type de la moyenne (l'écart type est également acceptable) et la taille d'échantillon pour chaque groupe. Des tableaux de données individuelles devront également être inclus. Les valeurs individuelles, la moyenne, l'erreur type (écart type) et les valeurs de CV des résultats du témoin devront être examinées afin de déterminer si elles respectent les critères acceptables de cohérence avec les valeurs historiques attendues. Si les CV sont supérieures aux valeurs de CV indiquées dans le tableau 1 (voir paragraphe 25 et 26), il faudra déterminer, pour chaque poids d'organe, si des erreurs entachent l'enregistrement ou l'entrée des données ou si le laboratoire ne maîtrise pas encore la dissection soignée des tissus dépendant des androgènes et si un complément de formation ou de pratique serait justifié. Habituellement, les CV (écart type divisé par poids moyen de l'organe) sont reproductibles d'un laboratoire à l'autre et d'une étude à l'autre. Les données présentées incluent au moins les poids de prostate ventrale, de vésicule séminale, de muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux, des glandes de Cowper, du gland, du foie et les poids corporels ainsi que la variation de poids corporel entre le début de l'administration des doses et l'autopsie. Les données peuvent également être présentées après ajustement de covariance du poids corporel, mais sans omettre la présentation des données non ajustées. De surcroît, s'il n'y a pas séparation préputiale dans l'un quelconque des groupes, l'incidence de la séparation est notée et statistiquement comparée au groupe témoin en utilisant un test exact de Fisher.

▼ M5

63. Lors de la vérification des entrées des résultats dans l'ordinateur par comparaison aux fiches de résultats originelles afin d'en déterminer la précision, les valeurs de poids d'organes qui ne sont pas biologiquement plausibles ou varient de plus de trois écarts types par rapport à celles du groupe de traitement sont minutieusement examinées, et il faudra peut-être les rejeter comme étant vraisemblablement des erreurs de relevés.
64. La comparaison des résultats de l'étude avec les valeurs de CV de l'OCDE (dans le tableau 1) représente souvent une étape importante de l'interprétation en termes de validité des résultats de l'étude. Les données historiques concernant les groupes témoins qui ont reçu le véhicule sont conservées au laboratoire. Les données historiques concernant les réponses à des substances de référence positives, telles que TP et FT, sont également conservées au laboratoire. Les laboratoires peuvent de surcroît tester périodiquement la réponse à des agonistes et à des antagonistes d'androgènes faibles connus et conserver ces résultats. Ces données peuvent être comparées aux données dont dispose l'OCDE pour s'assurer que les méthodes du laboratoire présentent une précision statistique et une puissance statistique suffisantes.

▼ **M5***Appendice 1*

DÉFINITIONS

Androgénique: terme utilisé pour décrire une influence positive sur la croissance des tissus dépendant des androgènes.

Antiandrogénique: capacité d'une substance chimique à supprimer l'action de TP dans un organisme de mammifère.

Date de naissance: jour 0 après la naissance.

Dose: quantité de substance d'essai administrée. Dans le bioessai de Hershberger, la dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal expérimental par jour (mg/kg de poids corporel/jour).

Posologie: terme général recouvrant la dose, la fréquence d'administration et la durée d'administration.

Moribond: terme utilisé pour décrire un animal en train de mourir, c'est-à-dire proche de la mort.

Jour postnatal X: Xe jour de vie après le jour de la naissance.

Sensibilité: capacité d'une méthode d'essai à identifier correctement des substances chimiques dont la propriété est testée.

Spécificité: capacité d'une méthode d'essai à identifier correctement des substances chimiques qui n'ont pas la propriété testée.

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Validation: procédé scientifique destiné à caractériser les conditions et les limites opératoires d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence dans un objectif particulier.

Appendice 2

Note: Document préparé par le secrétariat du programme sur les lignes directrices à partir de l'accord conclu à la 6^e réunion du groupe d'étude sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA)

Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens

<p>Niveau 1 Tri et hiérarchisation des priorités en fonction des informations existantes</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- propriétés physiques et chimiques, par exemple poids moléculaire, réactivité, volatilité, biodégradabilité, --- exposition des êtres humains et de l'environnement, par exemple volume de production, rejet, modes d'utilisation) --- dangers, par exemple données toxicologiques disponibles 	
<p>Niveau 2 Essais in vitro livrant des données mécanistiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- affinité de liaison aux récepteurs des œstrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes, --- activation de la transcription --- genèse de l'aromatase et des stéroïdes in vitro --- reconnaissance/fixation sur le récepteur des hydrocarbures aromatiques --- relations quantitatives structure-activité (QSARs) --- dépistages préliminaires à haut débit, --- fonction thyroïdienne --- essai sur la vitellogénine des hépatocytes de poisson --- autres, selon les besoins 	
<p>Niveau 3 Essais in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme et effet endocrinien</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- essai titérotophique (œstrogènes) --- essai de Hershberger (androgènes) --- fonctions hormonales non médiées par récepteurs --- autres (par exemple thyroïde) 	<ul style="list-style-type: none"> --- essai sur la vitellogénine du poisson (œstrogènes)
<p>Niveau 4 Essais in vivo livrant des données sur plusieurs mécanismes et effets endocriniens</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- LD 407 [affinité [indicateurs (d'effets) commandés par des mécanismes endocriniens] --- essais de puberté chez les mâles et les femelles --- essai sur l'adulte mâle intact 	<ul style="list-style-type: none"> --- essai histopathologique sur les gonades des poissons --- essai sur la métamorphose des grenouilles
<p>Niveau 5 Essais in vivo fournissant des données sur des effets mettant en jeu des mécanismes endocriniens et d'autres</p>	<ul style="list-style-type: none"> --- étude de toxicité pour la reproduction sur une génération (LD 415 affinité) --- étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations (LD 416 affinité) --- essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (LD 421 affinité) --- étude combinée de toxicité/ doses répétées et de dépistage de la toxicité (LD 422 affinité) * Les améliorations éventuelles seront examinées par le Groupe de gestion de la validation des essais sur les mammifères (VMG mamm) --- essais portant sur une partie ou la totalité du cycle de vie des poissons, oiseaux, amphibiens et invertébrés (développement et reproduction) 	

NOTES SE RAPPORTANT AU CADRE CONCEPTUEL

▼ M5

NOTES SE RAPPORTANT AU CADRE CONCEPTUEL

- Note 1:* Il est possible d'entrer dans le cadre et d'en sortir à tous les niveaux, suivant la nature des informations nécessaires à des fins d'évaluation des dangers et des risques.
- Note 2:* Le niveau 5 relatif à l'écotoxicologie devrait inclure des indicateurs mettant en évidence le mode d'action des effets néfastes et d'éventuels dégâts au niveau des populations.
- Note 3:* S'il existe un modèle multimodal couvrant plusieurs des essais fournissant des données sur un seul indicateur, ce modèle remplace ces essais.
- Note 4:* L'évaluation de chaque substance chimique est à effectuer au cas par cas, à la lumière de toutes les informations disponibles et compte tenu de la fonction des niveaux du cadre.
- Note 5:* La version actuelle du cadre ne doit pas être considérée comme exhaustive. Aux niveaux 3, 4 et 5, elle inclut des essais déjà disponibles ou en cours de validation. Ces derniers sont provisoirement inclus; ils seront confirmés une fois mis au point et validés.
- Note 6:* La portée des essais du niveau 5 n'est pas strictement limitée. Les essais incorporés à ce niveau servent à l'évaluation des dangers et des risques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1988), Rapport de la première réunion du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA), 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman, R.I. (1962), Standard Methods Adopted by Official Organization, Academic Press, NY.
- (3) Gray, L.E. Jr, Furr, J., et Ostby, J.S. (2005), Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats, in Current Protocols in Toxicology, 16.9.1-16.9.15, J. Wiley and Sons Inc.
- (4) OCDE (2006), Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 62, ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OCDE (2008), Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 86, ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OCDE (2007), Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 73, ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W., Zeiger, E., Walker, M., Ashby, J., Onyon, L., et Gray, L.E. Jr (2006), The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol, Env. Health Persp., 114:1265-1269.

▼ **M5**

- (8) Owens, W., Gray, L.E., Zeiger, E., Walker, M., Yamasaki, K., Ashby, J., Jacob, E. (2007), The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies, *Environ. Health Perspect.*, 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky, V. (1932), The assay of testicular hormone preparations, *Biochem. J.*, 26:413-422.
- (10) Korenchevsky, V., Dennison, M., et Schalit, R. (1932), The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone, *Biochem. J.*, 26:1306-1314.
- (11) Eisenberg, E., et Gordan, G.S. (1950), The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 99:38-44.
- (12) Eisenberg, E., Gordan, G.S., et Elliott, H.W. (1949), Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity, *Endocrinology*, 45:113-119.
- (13) Hershberger, L., Shipley, E., et Meyer, R. (1953), Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83:175-180.
- (14) Hilgar, A.G., et Vollmer, E.P. (1964), *Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic*, Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman, R.I. (1969), Androgens and anabolic agents, in Dorfman, R.I. (ed) *Methods in Hormone Research*, volume IIA, New York, Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro, E.J. (2002), *Handbook of Neurotoxicology*, volume I, New York, Humana Press, p. 38.
- (17) OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OCDE (1982), *Organisation de coopération et de développement économiques — Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire*, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OCDE (2008), *Toxicité orale aiguë — Méthode de l'ajustement des doses*. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 425.
- (20) OCDE (2001), *Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 24, ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens e.a. (2006), The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol, *Env. Health Persp.*, 114:1265-1269. Voir section II, 'The dissection guidance provided to the laboratories': <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video, http://rmdmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html
- (23) OCDE (2008), *Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay*, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 90, ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OCDE (2008), *Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay*.
- (25) OCDE (2009), *Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties*, Series on Testing and Assessment, No. 115.

▼ **M5**

- (26) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (27) Les chapitres suivants de la présente annexe:
 - B.1 bis, Toxicité orale aiguë — Méthode de la dose prédéterminée
 - B.1 ter, Toxicité orale aiguë — Méthode de la classe de toxicité aiguë

▼ **M5****B.56 ÉTUDE ÉTENDUE DE TOXICITE POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 443 (2012) de l'OCDE. Elle s'appuie sur un projet d'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération F1 réalisée au cours des différents stades de la vie, proposé par le comité technique ACSA (Agricultural Chemical Safety Assessment) du Health and Environmental Sciences Institute (HESI) de l'ILSI (Institut international Life Science Institute), tel que publié dans Cooper e.a., 2006 (1). Plusieurs améliorations et clarifications ont été apportées à la méthodologie de l'étude afin de la rendre adaptable et de mettre en valeur l'importance de s'appuyer sur les connaissances existantes, tout en mettant à profit les observations en cours d'étude pour orienter et développer l'essai. La présente méthode d'essai fournit une description détaillée du mode opératoire de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération. Elle décrit trois cohortes d'animaux de génération F1:

cohorte 1: évaluation des effets observés sur la reproduction/le développement; cette cohorte peut ensuite être étendue à des animaux de génération F2,

cohorte 2: évaluation de l'impact potentiel de l'exposition aux produits chimiques sur le développement du système nerveux,

cohorte 3: évaluation de l'impact potentiel de l'exposition aux produits chimiques sur le développement du système immunitaire.

2. Il convient que les décisions d'étendre l'évaluation à une deuxième génération et d'exclure les cohortes servant à déterminer la neurotoxicité pour le développement et/ou l'immunotoxicité pour le développement soient prises sur la base des connaissances existantes concernant la substance d'essai, ainsi que des impératifs fixés par différentes autorités réglementaires. La présente méthode d'essai vise à détailler la manière dont l'étude peut être menée et dont il convient d'évaluer les diverses cohortes.
3. La procédure étayant la décision de déclencher en cours d'étude la production d'une seconde génération est décrite dans le document d'orientation n° 117 de l'OCDE (39) à l'intention des autorités réglementaires recourant aux déclencheurs internes.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET OBJECTIFS

4. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération vise principalement à évaluer les étapes de la vie non couvertes par les autres types d'études de toxicité et à examiner les effets potentiels d'une exposition pré- et postnatale aux produits chimiques. Pour mesurer les effets sur la reproduction, on songera d'abord à utiliser, s'ils sont disponibles, les résultats d'études à doses répétées [notamment études de dépistage de la toxicité pour la reproduction, comme la ligne directrice 422 de l'OCDE (32)], ou d'essais de dépistage à court terme des perturbateurs endocriniens, [par exemple bioessai utéro-trophique — méthode d'essai B.54 (36); bioessai de Hershberger, méthode d'essai B.55 (37)] pour mettre en évidence un impact sur les organes reproducteurs mâles et femelles. Ces résultats porteront par exemple sur la spermatogenèse (examen histopathologique des testicules) chez les mâles et sur les cycles œstraux, la numération des follicules/maturation des ovocytes et l'intégrité des ovaires (examen histopathologique) chez les femelles. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération permet donc d'examiner les effets sur la reproduction à partir d'interactions entre mâles et femelles, entre femelles et conceptus, et entre femelles et descendants et sur la génération F1 après la maturité sexuelle [voir document d'orientation n° 151 en appui à la présente méthode d'essai (40)].

▼ M5

5. La présente méthode d'essai est élaborée en vue de permettre l'évaluation des effets pré- et postnataux de produits chimiques sur le développement, ainsi que l'examen exhaustif de la toxicité systémique chez les femelles gravides et allaitantes et chez la descendance (petits et adultes). L'examen détaillé des principaux effets sur le développement, comme la viabilité de la descendance, la santé des nouveau-nés, le niveau de développement à la naissance et le développement physique et fonctionnel jusqu'à l'âge adulte, doit permettre de repérer les organes cibles spécifiques chez les descendants. En outre, l'étude fournira et/ou confirmera des informations quant aux effets de la substance d'essai sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles chez l'adulte. On tiendra notamment compte des paramètres suivants, sans s'y limiter: fonction gonadique, cycle œstral, maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, comportement d'accouplement, conception, gestation, mise bas et lactation. Par ailleurs, les résultats de l'évaluation de la neurotoxicité pour le développement et de l'immunotoxicité pour le développement caractériseront les effets potentiels sur ces systèmes. Les données découlant de ces essais devront permettre de déterminer les concentrations sans effet nocif observé (CSENO), les concentrations minimales avec effet nocif observé (CMENO) et/ou les doses de référence pour les divers effets évalués, et/ou servir à caractériser les effets repérés dans des études à doses répétées antérieures et/ou à orienter les essais ultérieurs.

6. Le protocole est représenté schématiquement à la figure 1. La substance d'essai est administrée en continu à plusieurs groupes de mâles et femelles sexuellement matures, à différentes doses échelonnées suivant une gradation. Cette génération parentale (P) reçoit la substance pendant un temps défini avant l'accouplement (période fixée d'après les informations disponibles sur la substance d'essai, mais ne pouvant pas être inférieure à 2 semaines) puis pendant une période d'accouplement de 2 semaines. Les mâles P sont ensuite traités au moins jusqu'au sevrage de la génération F1. Leur traitement dure au minimum 10 semaines et peut être prolongé s'il y a lieu de clarifier les effets sur la reproduction. Le traitement des femelles P se poursuit pendant la gestation et l'allaitement jusqu'au sacrifice, après le sevrage de leurs portées (soit 8 à 10 semaines de traitement). La descendance F1 reçoit encore la substance d'essai du sevrage jusqu'à l'âge adulte. En cas d'évaluation d'une seconde génération [voir document d'orientation n° 117 de l'OCDE (39)], la descendance F1 continue de recevoir le traitement jusqu'au sevrage des petits F2, ou jusqu'à la fin de l'étude.

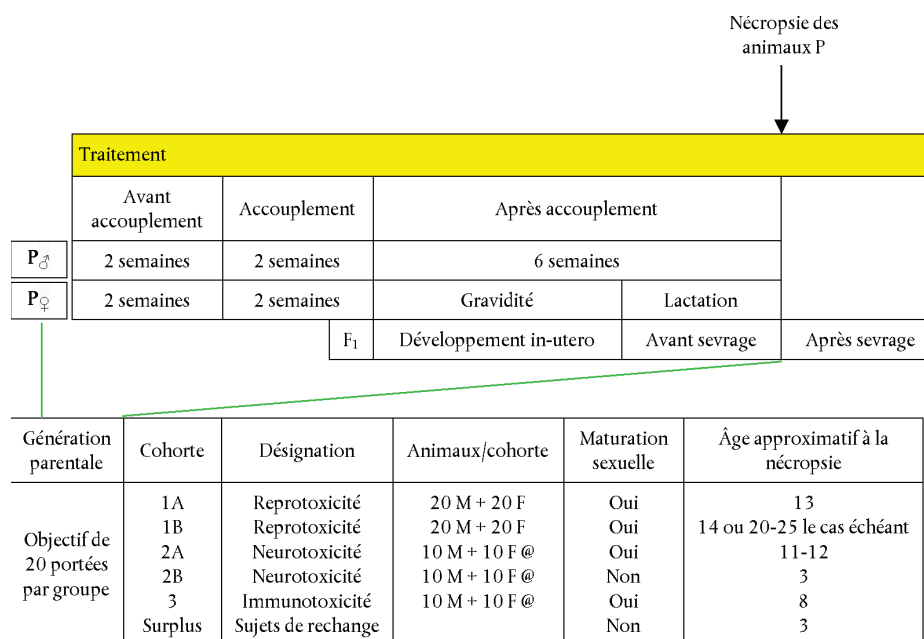
7. Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité; cet examen s'attache particulièrement à l'intégrité et au fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles ainsi qu'à la santé, la croissance, le développement et la fonction reproductrice de la descendance. Au moment du sevrage, les descendants sélectionnés sont affectés à divers sous-groupes (cohortes 1 à 3, voir paragraphes 33 et 34 et figure 1) afin de faire l'objet d'évaluations supplémentaires, portant notamment sur la maturation sexuelle, l'intégrité et le fonctionnement des organes reproducteurs, les effets neurologiques et comportementaux, et les fonctions immunitaires.

8. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (34).

▼ **M5**

9. Quand un nombre suffisant d'études aura été conduit afin d'analyser l'impact de cette nouvelle méthode d'essai, celle-ci sera examinée et, si nécessaire, révisée à la lumière de l'expérience acquise.

Figure 1

Protocole de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération

@ un par portée, représentatif si possible, de 20 portées au total

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE/PRÉPARATIONS POUR L'ESSAI

Animaux*Choix des espèces et des souches*

10. L'espèce utilisée pour l'étude de toxicité pour la reproduction est choisie avec soin en fonction de l'ensemble des données disponibles. Cependant, en raison de l'abondance des données existantes et de la comparabilité par rapport aux essais de toxicité générale, le choix se porte généralement sur le rat et les critères et recommandations présentés dans la présente méthode d'essai se rapportent à cette espèce. Si l'on utilise une autre espèce, il faut le justifier et adapter le protocole en conséquence. Les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement sont à éviter.

Âge, poids corporel et critères d'inclusion

11. On utilisera des animaux parents sains, n'ayant pas été soumis à des expériences antérieures. L'étude porte à la fois sur les mâles et les femelles, lesquelles sont nullipares et non gravides. Les animaux P sont sexuellement matures, de poids similaire (à sexe identique) au début du traitement, d'âge similaire (environ 90 jours) au moment de l'accouplement, et représentatifs de l'espèce et de la souche étudiés. Ils sont acclimatés pendant au moins 5 jours après leur arrivée au laboratoire. Les animaux sont répartis au hasard entre groupes de traitement et groupes témoins, de manière que les poids moyens de chaque groupe soient comparables (c'est-à-dire à $\pm 20\%$ de la moyenne globale).

▼ **M5***Conditions d'encagement et d'alimentation*

12. L'animalerie est à 22 °C (\pm 3 °C), avec une humidité relative située entre 30 et 70 %, l'idéal étant qu'elle soit maintenue entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. On contrôlera attentivement la teneur en phytoœstrogènes de l'alimentation, qui est susceptible, si elle est élevée, de modifier certains effets sur la reproduction. Les régimes alimentaires standard à formulation libre, dans lesquels la teneur en substances œstrogéniques a été réduite, sont recommandés (2) (30). Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, lorsque celle-ci est administrée dans les aliments. Il convient de vérifier la concentration, l'homogénéité et la stabilité de la substance d'essai dans l'alimentation. La nourriture et l'eau de boisson seront analysées régulièrement pour rechercher des contaminants. Des échantillons de chaque lot de nourriture utilisé au cours de l'étude sont conservés dans des conditions appropriées (par exemple congelés à -20 °C), jusqu'à la finalisation du rapport, dans l'éventualité où les résultats exigeraient une analyse supplémentaire des ingrédients consommés.

13. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe recevant la même dose. On envisagera un encagement individuel pour éviter d'éventuelles blessures (par exemple entre mâles après la période d'accouplement). Il convient que l'accouplement se déroule dans des cages propices à cette fin. Dès constatation de la copulation, les femelles présumées gravides sont hébergées séparément dans des cages destinées à la mise bas ou à la maternité, où leur sont fournis des matériaux de nidification appropriés et déterminés. Les portées sont hébergées avec leur mère jusqu'au sevrage. Les animaux F1 sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe et recevant la même dose, du sevrage au sacrifice. On peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Le type de litière choisi contient le moins possible de phytoœstrogènes.

Nombre et identification des animaux

14. Normalement, chaque groupe d'essai ou groupe témoin contient un nombre de couples suffisant pour produire au moins 20 femelles gravides par groupe de dose. On cherche à obtenir suffisamment de gestations pour assurer une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gravidité et le comportement maternel de la génération P, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité. Si le nombre de femelles gravides souhaité n'est pas atteint, l'étude n'est pas nécessairement invalidée et chaque échec sera analysé au cas par cas pour rechercher d'éventuels liens de cause à effet avec la substance d'essai.

15. Chaque animal P se voit attribuer un numéro d'identification unique avant le début du traitement. Si les données historiques du laboratoire suggèrent qu'une part importante des femelles est susceptible de ne pas présenter des cycles œstraux réguliers (de 4 ou 5 jours), il est conseillé d'étudier les cycles œstraux avant d'administrer les doses. Une autre option consiste à agrandir les groupes de façon à garantir qu'au moins 20 femelles dans chaque groupe présentent des cycles œstraux réguliers (4 ou 5 jours) au moment de commencer le traitement. Tous les descendants F1 sont identifiés de manière unique lors du premier examen des nouveau-nés effectué le jour de leur naissance (jour postnatal: JPN 0) ou un jour après (JPN 1). Tout au long de l'étude, on gardera la trace de la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1, puis de la génération F2 si elle est produite.

▼ **M5****Substance d'essai***Informations disponibles sur la substance d'essai*

16. Il importe d'examiner les données existantes pour choisir la voie d'administration, le véhicule et l'espèce utilisée, sélectionner les doses et éventuellement adapter le programme de traitement. Ainsi, il convient que la planification d'une étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération tienne compte de toutes les informations pertinentes disponibles concernant la substance d'essai, à savoir propriétés physico-chimiques, toxicocinétiques (y compris métabolisme propre à l'espèce) et toxicodynamiques, relations structure-activité (RSA), mécanismes métaboliques in vitro, résultats des études de toxicité antérieures et données utiles sur les analogues de structure. Certaines informations préliminaires sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME), ainsi que sur la bioaccumulation, peuvent être déduites de la structure chimique, des données physico-chimiques, de la capacité de liaison aux protéines plasmatiques ou des études toxicocinétiques; les résultats des études de toxicité livrent des informations supplémentaires, notamment sur la CSENO, le métabolisme ou l'induction du métabolisme.

Prise en compte des données toxicocinétiques

17. Même si elles ne sont pas obligatoires, les données toxicocinétiques tirées d'études antérieures préliminaires de détermination des concentrations ou autres études sont extrêmement utiles pour planifier l'étude, sélectionner les niveaux de dose et interpréter les résultats. Sont particulièrement utiles les données qui: 1) vérifient l'exposition à la substance d'essai (ou à ses métabolites importants) des fœtus et des petits en cours de développement, 2) livrent une estimation de la dosimétrie interne et 3) évaluent la saturation potentielle des mécanismes cinétiques en fonction de la dose. Il convient aussi de prendre en compte, lorsqu'elles sont disponibles, d'autres informations toxicocinétiques comme le profil des métabolites, la fonction concentration-temps, etc. On pourra aussi recueillir pendant l'étude principale des données toxicocinétiques supplémentaires, à condition que cela n'interfère pas avec la détermination et l'interprétation des principaux effets étudiés.

En règle générale, les données toxicocinétiques suivantes seront utiles pour planifier l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération:

- en fin de gestation (par exemple au 20^e jour de gestation) — sang de la mère et du fœtus,
- au milieu de l'allaitement (JPN 10) — sang maternel, sang du petit et/ou lait,
- peu après le sevrage (par exemple JPN 28) — échantillons sanguins des petits sevrés.

La souplesse sera de mise dans la détermination des substances spécifiques à analyser (par exemple la substance parente et/ou ses métabolites) et du programme d'échantillonnage. Par exemple, le nombre et le moment des prélèvements d'échantillons le jour prévu dépendront des voies d'exposition et des connaissances existantes concernant les propriétés toxicocinétiques chez les animaux non gravides. Quand la substance d'essai est administrée dans la nourriture, il suffit de prélever les échantillons à heure fixe les jours concernés, tandis que pour l'administration par gavage, des prélèvements supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires dans la même journée pour obtenir une meilleure estimation de la gamme des doses internes. Il n'est toutefois pas nécessaire de tracer l'intégralité de la fonction concentration-temps, pour quelque jour de prélèvement que ce soit. Si nécessaire, les prélèvements sanguins destinés aux analyses des fœtus et des nouveau-nés peuvent être regroupés par sexe pour une même portée.

▼ M5*Voie d'administration*

18. Il convient que le choix de la voie d'administration tienne compte de la voie ou des voies les plus appropriées à l'exposition humaine. Bien que le protocole prévoit l'administration de la substance d'essai dans la nourriture, il peut être modifié au profit d'une autre voie (eau de boisson, gavage, inhalation, voie cutanée), en fonction des caractéristiques de la substance chimique et des informations recherchées.

Choix du véhicule

19. S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, de recourir en priorité à une solution ou suspension aqueuse, ou à défaut à une solution ou suspension huileuse (par exemple dans l'huile de maïs). Si le véhicule n'est pas aqueux, il convient que sa toxicité soit connue. Les véhicules susceptibles de présenter une toxicité intrinsèque sont à proscrire (par exemple acétone, DMSO). Il faut déterminer la stabilité de la substance d'essai dans le véhicule. Il convient en outre de tenir compte des caractéristiques suivantes lorsqu'un véhicule ou un autre adjuvant est utilisé pour faciliter l'administration: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

Choix des doses

20. Normalement, l'étude porte sur au moins trois niveaux de dose et un témoin concomitant. Pour sélectionner les niveaux de dose appropriés, l'expérimentateur tient compte de toutes les informations disponibles, y compris les données relatives au dosage des études antérieures, les résultats toxicocinétiques concernant les animaux gravides ou non gravides, l'importance du transfert dans le lait, et les estimations de l'exposition humaine. Si les données toxicocinétiques disponibles indiquent une saturation des mécanismes toxicocinétiques en fonction de la dose, on s'efforcera d'éviter les doses élevées induisant clairement une saturation, à condition, bien entendu, que les expositions humaines attendues soient bien inférieures à ce seuil de saturation. Le niveau de la dose maximale devra alors correspondre au point d'inflexion vers un comportement toxicocinétique non linéaire, ou lui être légèrement supérieur.
21. À défaut de données toxicocinétiques pertinentes, les niveaux de dose sont définis en fonction des effets toxiques, dans la limite des propriétés physiques/chimiques de la substance d'essai. Si les niveaux de dose sont fixés d'après la toxicité, la dose maximale est celle qui induit une certaine toxicité systémique, sans provoquer de décès ni de souffrances aiguës des animaux.
22. On sélectionnera une séquence de doses décroissantes afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et de déterminer les CSENO ou les doses proches de la limite de détection, ce qui permettra de déduire une dose de référence pour le(s) paramètre(s) d'évaluation le(s) plus sensible(s). Pour éviter des écarts de dose importants entre CSENO et CMENO, le recours à des multiples de deux ou quatre est généralement optimal. L'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à l'application d'intervalles très espacés (par exemple supérieur à un facteur 10) entre les doses.
23. Les animaux du groupe témoin sont manipulés de la même manière que les animaux traités, à l'exception du fait qu'ils ne reçoivent pas la substance d'essai. Ce groupe témoin ne sera pas traité ou recevra un placebo, ou le véhicule si l'administration de la substance d'essai en nécessite un. Si un véhicule est employé, les animaux du groupe témoin devront recevoir le plus grand volume utilisé de ce véhicule.

▼ **M5***Essai limite*

24. Si des essais à doses répétées conduits à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ne produisent aucun effet toxique observable, ou s'il n'y a pas de raison de penser que la substance est toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de composés présentant une structure et/ou une action métabolique similaires et des propriétés métaboliques in vivo/in vitro similaires, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. Dans cette éventualité, l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération se limitera à un groupe témoin et à une dose unique d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Cependant, si cette dose limite provoque des signes de toxicité pour la reproduction ou le développement, d'autres études conduites à des doses inférieures s'imposent pour définir une CSENO. Ces remarques concernant l'essai limite ne sont valables que si le niveau de l'exposition humaine n'implique pas d'évaluer des doses supérieures.

PROTOCOLES**Exposition de la descendance**

25. On privilégiera l'administration dans la nourriture comme voie d'exposition. Dans le cas des études par gavage, il faut noter que, normalement, les petits ne recevront 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 d'allaitement. La méthodologie est modifiée lorsque l'excrétion de la substance d'essai dans le lait est faible ou que l'exposition continue de la descendance n'est pas avérée. Dans ces cas, on envisagera de traiter directement les petits pendant l'allaitement en fonction des données toxicocinétiques disponibles, de la toxicité pour la descendance ou de l'évolution des biomarqueurs (3), (4). Il convient d'évaluer soigneusement les avantages et les inconvénients avant la mise en œuvre d'études d'administration directe aux petits allaités (5).

Programme de traitement et administration des doses

26. Il se peut qu'on dispose d'informations sur les cycles œstraux, de données histopathologiques sur les tractus reproducteurs mâles et femelles et d'analyses des spermatozoïdes testiculaires/épididymaires provenant d'études de toxicité à doses répétées antérieures d'une durée adéquate. Pour ce qui est de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, la durée du traitement avant l'accouplement doit donc permettre de détecter les effets des modifications fonctionnelles susceptibles de perturber le comportement d'accouplement et la fertilisation. Il convient que le traitement avant l'accouplement dure suffisamment longtemps pour atteindre des conditions d'exposition stables chez les mâles et les femelles P. Généralement, une période de 2 semaines conviendra pour les deux sexes. Chez les femelles, cette période correspond à 3 à 4 cycles œstraux complets et devrait suffire à identifier d'éventuels effets nocifs sur la cyclicité. Chez les mâles, elle correspond à la durée nécessaire à la migration des spermatozoïdes en maturation dans l'épididyme, et devrait permettre de détecter les effets posttesticulaires sur le sperme (au cours des derniers stades de la spermiation et de la maturation des spermatozoïdes épididymaires) au moment de l'accouplement. Au moment du sacrifice, quand l'examen histopathologique des testicules et épididymes et l'analyse des caractéristiques du sperme sont programmés, les mâles P et F1 auront donc été exposés à la substance d'essai pendant au moins un cycle entier de spermatogenèse [(6) (7) (8) (9) et document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)].

▼ **M5**

27. Les scénarios d'exposition des mâles avant l'accouplement peuvent être adaptés si des études antérieures ont clairement mis en évidence une toxicité testiculaire (anomalie de la spermatogenèse) ou des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des spermatozoïdes. De la même manière, pour les femelles, l'existence d'effets avérés de la substance d'essai sur les cycles œstraux et, par conséquent, sur la réceptivité sexuelle peut motiver une modification des scénarios d'exposition avant l'accouplement. Dans certains cas particuliers, on pourra attendre de détecter des spermatozoïdes par frottis vaginal avant de commencer le traitement des femelles P [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)].
28. Une fois que la durée de la période d'exposition avant l'accouplement est définie, les animaux sont traités en continu avec la substance d'essai, 7 jours sur 7 jusqu'à la nécropsie. Le mode d'administration sera le même pour tous les animaux. Le traitement se poursuivra pendant les deux semaines de la période d'accouplement et, pour les femelles P, au cours de la gestation puis de l'allaitement jusqu'à leur sacrifice après le sevrage. Les mâles seront traités de la même façon jusqu'à leur sacrifice, au moment du sevrage des animaux F1. En ce qui concerne la nécropsie, la priorité est donnée aux femelles qui seront nécropsiées le même jour ou un jour similaire de lactation. La nécropsie des mâles peut s'étaler sur un plus grand nombre de jours, selon les équipements du laboratoire. À moins d'avoir débuté pendant la période de lactation, l'administration de la substance d'essai directement aux mâles et femelles F1 sélectionnés commence au moment du sevrage et se poursuit jusqu'à la date programmée pour la nécropsie, en fonction de la cohorte.
29. Il importe de s'assurer que les quantités de substance administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est ajoutée à la nourriture, 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 retenue.
30. Si la substance d'essai est administrée par gavage, le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne dépasse pas 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100 g de poids pour l'huile, de maïs par exemple). S'il ne s'agit pas de substances irritantes ou corrosives dont les effets doivent 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. Le produit est administré chaque jour à heure fixe. La dose reçue par chaque animal est normalement calculée sur la base de la pesée la plus récente de l'animal, et est ajustée au moins une fois par semaine pour les mâles adultes et les femelles adultes non gravides, et tous les deux jours pour les femelles gravides et les descendants F1 si elle est administrée avant le sevrage et pendant les deux semaines qui suivent le sevrage. Si les données toxicocinétiques indiquent un faible transfert de la substance d'essai dans le placenta, il faudra éventuellement revoir la dose administrée par gavage pendant la dernière semaine de gestation afin d'éviter de traiter la mère avec une dose excessivement toxique. Le jour de la mise bas, les femelles ne sont pas traitées par gavage ou toute autre voie d'administration impliquant la manipulation de l'animal; il est en effet préférable de ne pas les traiter ce jour-là plutôt que de perturber le processus de la naissance.

▼ **M5****Accouplement**

31. Chaque femelle P est placée avec un seul mâle non apparenté choisi au hasard dans le même groupe de dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Si le nombre de mâles est insuffisant, en raison par exemple de décès de mâles avant la mise en couple, on pourra placer un ou plusieurs des mâles s'étant déjà accouplé(s) avec une seconde femelle (1:1), afin que toutes les femelles aient un partenaire. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (observation de sperme ou d'un bouchon vaginal). Les animaux sont séparés dès que possible une fois que la copulation a été confirmée. Si les animaux ne se sont toujours pas accouplés au bout de deux semaines, ils sont séparés sans autre tentative d'accouplement. Les couples sont clairement identifiés dans les résultats.

Taille des portées

32. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de cinq mâles et cinq femelles par portée. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel. Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple six mâles et quatre femelles).

Sélection des petits pour les études après le sevrage (voir figure 1)

33. Au moment du sevrage (vers le JPN 21), on sélectionne des petits de toutes les portées disponibles, avec un maximum de 20 portées par groupe de dose et témoin, afin de les soumettre à des examens ultérieurs et de les élever jusqu'à la maturation sexuelle (sauf si des essais sont nécessaires avant). La sélection des petits est aléatoire, si ce n'est qu'il convient d'écarter les individus clairement chétifs (dont le poids corporel est inférieur de plus de deux écarts-types au poids moyen des petits de la même portée), dans la mesure où ils ne sont sans doute pas représentatifs du groupe de traitement.

Au JPN 21, les petits F1 sélectionnés sont affectés au hasard à l'une des trois cohortes d'animaux suivantes:

cohorte 1 (1A et 1B) = essai de toxicité pour la reproduction/le développement,

cohorte 2 (2A et 2B) = essai de neurotoxicité pour le développement,

cohorte 3 = essai d'immunotoxicité pour le développement.

Cohorte 1A: un mâle et une femelle/portée/groupe (20/sexe/groupe): sélection prioritaire pour l'évaluation primaire des effets sur l'appareil reproducteur et de la toxicité générale.

Cohorte 1B: un mâle et une femelle/portée/groupe (20/sexe/groupe): sélection prioritaire pour l'évaluation ultérieure de la capacité de reproduction lors de l'accouplement d'animaux F1 [voir document d'orientation n° 117 de l'OCDE (39)] et pour obtenir des informations histopathologiques supplémentaires dans le cas d'agents présumés toxiques pour la reproduction ou le système endocrinien, ou quand les résultats de la cohorte 1A sont équivoques.

Cohorte 2A: total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe; 1 mâle ou 1 femelle par portée) destinés à des tests neurocomportementaux suivis d'un examen neurohistopathologique à l'âge adulte.

Cohorte 2B: total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe; 1 mâle ou 1 femelle par portée) destinés à un examen neurohistopathologique au moment du sevrage (JPN 21 ou JPN 22). Si les animaux ne sont pas assez nombreux, ils seront affectés en priorité à la cohorte 2A.

▼ **M5**

Cohorte 3: total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe, dont 1 individu par portée, si possible). Il pourra y avoir lieu d'utiliser des petits supplémentaires issus du groupe témoin, qui serviront de témoins positifs pour l'essai de réponse anticorps dépendante des lymphocytes T, au JPN 56 ± 3 .

34. Si l'une des portées ne compte pas suffisamment de petits pour toutes les cohortes, ils sont affectés en priorité à la cohorte 1, qui peut ensuite servir à produire une génération F2. Il est possible d'affecter davantage de petits à l'une des cohortes en cas de préoccupations spécifiques, par exemple quand une substance chimique est présumée neurotoxique, immunotoxique ou reprotoxique. Ces petits pourront servir à des examens menés à des moments différents ou pour l'évaluation d'effets supplémentaires. Les petits non affectés aux cohortes feront l'objet d'un examen biochimique clinique (paragraphe 55) et d'une nécropsie macroscopique (paragraphe 68).

Second accouplement des animaux P

35. On déconseille généralement de procéder à un second accouplement des animaux P, ce qui entraînerait la perte d'informations importantes sur le nombre de points d'implantation (et donc de données postimplantation et périnatales, indicatrices d'une éventuelle action tératogène) concernant la première portée. S'il y a lieu de vérifier ou d'élucider un effet chez les femelles exposées, il est préférable d'étendre l'étude à un accouplement de la génération F1. Cependant, il est toujours possible de procéder à un second accouplement des mâles P avec des femelles non traitées afin de clarifier les résultats équivoques ou pour mieux caractériser les effets sur la fertilité observés à la suite du premier accouplement.

OBSERVATIONS IN VIVO

Observations cliniques

36. Les animaux P et F1 sélectionnés font l'objet d'une observation clinique générale quotidienne. Si l'administration se fait par gavage, ces observations cliniques auront lieu avant et après le traitement (pour rechercher d'éventuels signes de toxicité associés aux pics de concentration plasmatique). On note les changements de comportement pertinents, les signes de mise bas prolongée ou difficile et tous les signes de toxicité. Deux fois par jour, ou une fois par jour pendant le week-end, on surveille les manifestations de toxicité sévère, la morbidité et la mortalité sur l'ensemble des animaux.
37. En outre, tous les individus P et F1 (après le sevrage) font l'objet une fois par semaine d'un examen plus détaillé, qu'il sera commode d'effectuer à l'occasion d'une pesée de l'animal, ce qui limitera le stress lié à la manipulation. Les observations sont effectuées avec soin et consignées conformément aux systèmes de cotation définis par le laboratoire d'essai. On s'attache particulièrement à réduire au minimum les variations affectant les conditions de l'essai. Les observations notées portent, sans que cette liste soit exhaustive, sur les modifications de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, sur l'apparition de sécrétions et d'excrétions et sur les activités réflexes (par exemple larmes, érection des poils, diamètre de la pupille, rythme respiratoire inhabituel). Il convient également de noter tout changement dans la démarche ou la posture, les réactions à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypes (par exemple toilettage excessif, circuits répétitifs) ou de comportements bizarres (par exemple automutilation, marche à reculons).

▼ **M5****Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau**

38. Les animaux P sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. En outre, les femelles P sont pesées pendant l'allaitement, les mêmes jours que la pesée des petits de leurs portées (voir paragraphe 44). Tous les animaux F1 sont pesés individuellement au moment du sevrage (JPN 21) et au moins chaque semaine par la suite. On relève aussi le poids corporel des animaux le jour où ils atteignent la puberté (séparation préputiale ou ouverture vaginale observables). Tous les animaux sont pesés au moment du sacrifice.
39. Au cours de l'étude, la consommation de nourriture et d'eau (si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson) est consignée au moins une fois par semaine, le même jour que la pesée des animaux (sauf pendant la cohabitation). La consommation de nourriture de chaque cage d'animaux F1 est notée une fois par semaine, dès l'affectation à une cohorte particulière.

Cycles œstraux

40. Les éventuelles informations préliminaires concernant les effets de la substance d'essai sur le cycle œstral, fournies par de précédentes études de toxicité à doses répétées, pourront être mises à profit pour élaborer un protocole d'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération propre à la substance chimique concernée. Normalement, l'évaluation de la cyclicité œstrale (par cytologie vaginale) commence au début de la période de traitement et se poursuit jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré ou jusqu'à la fin de la période d'accouplement de deux semaines. Si l'on a vérifié la normalité des cycles œstraux des femelles avant d'administrer la substance d'essai, il est utile de poursuivre les frottis quand le traitement démarre, mais si l'on craint des effets non spécifiques au démarrage du traitement (par exemple une baisse marquée de la consommation de nourriture), on pourra laisser les animaux s'adapter au traitement pendant 2 semaines au maximum avant la période d'observation des frottis (de 2 semaines) qui précède la période d'accouplement. Si l'on prolonge ainsi la période de traitement des femelles (ce qui porte à 4 semaines le traitement avant accouplement), on pourra envisager d'acheter les animaux plus jeunes et de rallonger aussi la période de traitement des mâles avant la mise en couple. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (10) (11).
41. Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour pour l'ensemble des femelles F1 de la cohorte 1A, à partir de l'ouverture du vagin jusqu'à l'observation des premières cellules kératinisées, afin de déterminer l'intervalle de temps entre ces deux événements. Il convient également de suivre les cycles œstraux de toutes les femelles F1 de la cohorte 1A pendant 2 semaines, à partir du 75^e jour postnatal environ. En outre, si l'accouplement de la génération F1 s'impose, la cytologie vaginale des femelles de la cohorte 1B se poursuivra depuis la mise en couple jusqu'à ce que la copulation ait eu lieu.

Accouplement et gravidité

42. Outre les paramètres standard (par exemple poids corporel; consommation de nourriture; observations cliniques, dont contrôle de la mortalité/morbidité), on relève les dates de mise en couple, d'insémination et de mise bas, et on calcule l'intervalle précoïtal (entre la mise en couple et l'insémination) et la durée de la gestation (entre l'insémination et la mise bas). Il convient d'examiner minutieusement les femelles P au moment prévu pour la mise bas afin de repérer d'éventuels symptômes de dystocie. Toute anomalie du comportement de nidification ou d'allaitement devra être relevée.

▼ **M5**

43. Le jour de la parturition correspond au jour 0 de l'allaitement pour la mère, et au jour postnatal 0 (JPN 0) pour la descendance. Il est aussi possible de compter les jours à partir de la copulation pour éviter les erreurs sur les données relatives au développement postnatal dues aux différences de durée de gestation; il convient toutefois de noter également les jours à partir de la mise bas. Ce changement de référence est particulièrement important lorsque la substance d'essai influence la durée de la gestation.

Caractéristiques de la descendance

44. On examine chaque portée dès que possible après la mise bas (JPN 0 ou 1) afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques [anomalies externes visibles (y compris fentes palatines, hémorragies sous-cutanées, anomalies de la couleur ou de la texture de la peau, présence du cordon ombilical, absence de lait dans l'estomac, présence de sécrétions séchées)]. De plus, le premier examen clinique des nouveau-nés est l'occasion d'effectuer une évaluation qualitative de la température corporelle, du degré d'activité et de la réaction à la manipulation. Chez les petits morts à JPN 0 ou plus tard, on recherche d'éventuelles anomalies et la cause du décès. Les petits en vie sont comptés et pesés individuellement à JPN 0 ou JPN 1, puis régulièrement, par exemple au moins aux JPN 4, 7, 14 et 21. Les examens cliniques, qui dépendent de l'âge des animaux, sont répétés à chaque pesée des descendants, voire plus souvent si des cas spécifiques ont été révélés au moment de la naissance. Les symptômes à surveiller sont notamment les suivants (liste non exhaustive): anomalies externes, modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives. Il convient également de noter tout changement dans la démarche ou la posture, les réactions à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypies ou de comportements bizarres.
45. On mesure la distance anogénitale (DAG) de chaque petit au moins une fois entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG, qui est rapportée à la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (12). On recherche la présence de tétons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13.
46. On commence à surveiller quotidiennement les signes de séparation balano-préputiale ou d'ouverture vaginale sur tous les animaux F1 avant le jour prévu d'apparition de ces signes, afin de détecter une éventuelle maturation sexuelle précoce. Toute anomalie persistante des organes génitaux, telle que filaments vaginaux, hypospadias ou pénis bifide est notée. La maturité sexuelle des animaux F1 est comparée au développement physique en déterminant l'âge et le poids corporel au moment de la séparation balano-préputiale chez le mâle ou de l'ouverture vaginale chez la femelle (13).

Évaluation du potentiel de neurotoxicité pour le développement (cohortes 2A et 2B)

47. L'évaluation de la neurotoxicité s'appuie sur les individus des cohortes 2A et 2B, qui comptent chacune 10 mâles et 10 femelles issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée; chaque portée représentée par au moins 1 petit; sélection au hasard). Les animaux de la cohorte 2A seront soumis à une batterie d'observations fonctionnelles, à une évaluation du réflexe de sursaut auditif, de l'activité motrice (voir paragraphes 48-50) et à une évaluation neuropathologique (voir paragraphes 74 et 75). On s'attachera particulièrement à réduire au minimum les variations affectant

▼ M5

l'ensemble des conditions de l'essai et à s'assurer qu'elles ne sont pas systématiquement liées au traitement. Parmi les variables susceptibles de jouer sur le comportement figurent le niveau sonore (par exemple bruits intermittents), la température, l'humidité, l'éclairage, les odeurs, l'heure du jour et les distractions liées à l'environnement extérieur. Il convient d'interpréter les résultats des essais de neurotoxicité en fonction des ordres de grandeur de référence appropriés provenant des groupes témoins historiques. L'évaluation neuropathologique des animaux de la cohorte 2B aura lieu aux JPN 21 ou 22 (voir paragraphes 74 et 75).

48. On testera le réflexe de sursaut auditif des animaux de la cohorte 2A au JPN 24 (\pm 1 jour). L'évaluation des groupes traités et témoins est répartie de manière équilibrée au cours de la journée. Chaque session comporte 50 essais. Pour ces tests de sursaut auditif, on calculera l'amplitude de la réponse moyenne pour chaque bloc de 10 essais (5 blocs de 10 essais), dont les conditions sont optimisées pour permettre une accoutumance intrasession. Ces protocoles sont conformes à la méthode d'essai B.53 (35).
49. À un moment approprié entre les JPN 63 et 75, les animaux de la cohorte 2A sont soumis à la batterie d'observations fonctionnelles ainsi qu'à un test automatisé de motricité. Ces procédures sont conformes aux méthodes d'essai B.43 (33) et B.53 (35). La batterie d'observations fonctionnelles comprend une description complète de l'apparence, du comportement et de l'intégrité fonctionnelle du sujet. Ces évaluations sont basées sur des observations effectuées dans la cage d'hébergement puis dans un espace d'observation normalisé (plan ouvert) où l'animal peut se déplacer librement, et sur des tests de manipulation. On procédera aux essais par ordre d'interactivité croissante. Une liste de mesures est présentée à l'appendice 1. Tous les animaux sont examinés soigneusement par des observateurs formés à cet effet et ignorant le traitement reçu par l'animal, suivant des protocoles normalisés destinés à limiter la variabilité liée à l'observateur. Dans la mesure du possible, il est recommandé de confier au même observateur l'évaluation de tous les animaux d'un test donné. À défaut, il convient de démontrer la fiabilité interobservateurs. Pour chaque paramètre de la batterie de tests comportementaux, il faudra se référer à des échelles et des critères de cotation dont les modes opératoires sont définis explicitement. Si possible, des mesures quantitatives objectives sont effectuées pour les observations impliquant une cotation subjective. Concernant l'activité motrice, chaque animal est testé individuellement. La séance d'essai dure assez longtemps pour permettre de démontrer l'accoutumance intrasession des témoins. L'activité motrice est contrôlée à l'aide d'un appareil d'enregistrement automatique capable de détecter aussi bien des augmentations que des diminutions d'activité (c'est-à-dire que l'activité de base mesurée par le dispositif ne doit pas être trop faible, ce qui empêcherait la détection des diminutions d'activité, ni trop forte, ce qui empêcherait la détection d'augmentations). Tous les appareils sont testés selon des protocoles standard afin de garantir, dans la mesure du possible, la reproductibilité entre appareils et entre dates de mesure. Il convient d'équilibrer au mieux les groupes de traitement affectés à chaque appareil. Les groupes d'évaluation de l'essai sont répartis sur la journée pour tenir compte des rythmes d'activité circadiens.
50. S'il existe des informations indiquant que d'autres essais fonctionnels s'imposent (par exemple sensoriels, sociaux, cognitifs), ces essais seront inclus dans le protocole de l'étude sans compromettre l'intégrité des autres évaluations prévues. Si ces autres essais portent sur les mêmes animaux que ceux soumis au test du sursaut auditif, à la batterie d'observations fonctionnelles et au test de motricité, il convient de les programmer à des moments différents pour limiter le risque de perturbation. Des protocoles supplémentaires peuvent se révéler particulièrement utiles lorsque l'observation empirique, les effets anticipés ou divers aspects liés au mécanisme ou au mode d'action suggèrent un type spécifique de neurotoxicité.

▼ **M5****Évaluation du potentiel d'immunotoxicité pour le développement (cohorte 3)**

51. Au JPN 56 (\pm 3 jours), 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 3 issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée; chaque portée représentée par au moins 1 petit; sélection au hasard) seront soumis à un essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T, pour rechercher des anticorps IgM produits au cours de la réponse primaire à un antigène dépendant des lymphocytes T, par exemple les globules rouges de mouton (GRM) ou l'hémocyanine de patelle (KLH); ces essais seront conformes aux protocoles actuels d'étude de l'immunotoxicité (14) (15). La réponse peut être évaluée par comptage des cellules formatrices de plaques (CFP) spécifiques dans la rate ou par titrage sérique des anticorps IgM spécifiques aux GRM ou à la KLH par ELISA, au moment du pic de réponse. En général, les réponses atteignent un pic 4 jours (pour le comptage des CFP) ou 5 jours (par ELISA) après l'immunisation par voie intraveineuse. Si la réponse primaire des anticorps est évaluée par comptage des CFP, il est permis de répartir les animaux en sous-groupes évalués à des jours différents, aux conditions suivantes: l'intervalle entre l'immunisation et le sacrifice d'un sous-groupe est défini de manière que les CFP soient sacrifiés au moment du pic de la réponse; les sous-groupes contiennent le même nombre de descendants mâles et femelles issus de tous les groupes de dose, y compris les témoins; et les sous-groupes sont examinés à peu près au même âge postnatal. On continuera d'administrer la substance d'essai jusqu'au jour qui précède le prélèvement de la rate des animaux pour l'évaluation de la réponse des CFP ou du sérum pour l'essai ELISA.

Évaluation ultérieure du potentiel de reprotoxicité (cohorte 1B)

52. On peut continuer d'administrer le traitement aux animaux de la cohorte 1B au-delà du JPN 90, et les élever pour produire une génération F2 si nécessaire. Les mâles et les femelles d'un même groupe de dose cohabitent (en évitant d'accoupler les membres d'une même fratrie) pour une durée allant jusqu'à 2 semaines, à partir du JPN 90 ou après, mais pas au-delà du JPN 120. Les protocoles sont les mêmes que pour les animaux P. Cependant, sur la base du poids de la preuve, il peut s'avérer suffisant de sacrifier les portées au JPN 4 au lieu de les évaluer jusqu'au sevrage ou au-delà.

OBSERVATIONS FINALES

Biochimie clinique/hématologie

53. On surveillera les effets systémiques chez les animaux P. Des échantillons sanguins sont prélevés à jeun sur un site défini chez dix mâles et femelles P par groupe de dose, sélectionnés au hasard au moment du sacrifice. Ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées et font l'objet d'un examen hématologique partiel ou complet, d'un examen biochimique clinique, d'un dosage de T4 et TSH, ou d'autres examens suggérés par la connaissance du profil d'effets de la substance d'essai [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)]. Il convient d'évaluer les paramètres hématologiques suivants: hémocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, numération totale et différentielle des leucocytes, numération des plaquettes et mesure du temps et du potentiel de coagulation du sang. Dans le plasma ou le sérum, on mesure les éléments suivants: glucose, cholestérol total, urée, créatinine, protéines totales, albumine et au moins deux enzymes indicatrices d'effets sur les cellules hépatiques (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyl transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Dans certains cas, le dosage d'enzymes supplémentaires et des acides biliaires peut livrer des informations utiles. En outre, il est possible de

▼ **M5**

conserver des prélèvements sanguins de tous les animaux en vue d'une éventuelle analyse ultérieure destinée à clarifier les effets équivoques ou générer des données d'exposition interne. S'il n'est pas prévu de procéder à un second accouplement, les échantillons sont prélevés dans le cadre du sacrifice programmé ou juste avant. Lorsque les animaux sont maintenus en vie, les prélèvements ont lieu quelques jours avant le second accouplement. Par ailleurs, à moins que des études à doses répétées antérieures indiquent que la substance d'essai n'influe pas sur ce paramètre, il convient de procéder à une analyse d'urine avant le sacrifice, en évaluant les critères suivants: apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et globules rouges, débris cellulaires. Des prélèvements d'urine peuvent également être effectués afin de suivre l'excrétion de la substance d'essai et/ou de son ou ses métabolites.

54. On surveillera aussi les effets systémiques chez les animaux F1. Des échantillons sanguins sont prélevés à jeun sur un site défini chez 10 mâles et femelles de la cohorte 1A par groupe de dose, sélectionnés au hasard au moment du sacrifice. Ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées et font l'objet d'un examen biochimique clinique standard, et notamment d'une mesure de la concentration sérique des hormones thyroïdiennes (T4 et TSH), d'un examen hématologique (numération totale et différentielle des leucocytes plus érythrocytes) et d'une analyse d'urine.
55. Les petits surnuméraires au JPN 4 font l'objet d'une nécropsie macroscopique et on peut mesurer la concentration sérique de l'hormone thyroïdienne T4 à cette occasion. Si nécessaire, les échantillons sanguins des nouveau-nés (JPN 4) peuvent être regroupés par portée aux fins d'analyses biochimiques et du dosage d'hormones thyroïdiennes. Des échantillons sanguins sont également prélevés sur les sujets tout juste sevrés soumis à une nécropsie macroscopique au JPN 22 (petits F1 non sélectionnés pour les cohortes), afin de doser la T4 et la TSH.

Caractéristiques du sperme

56. On détermine les caractéristiques du sperme pour tous les mâles de la génération P, sauf s'il existe des données montrant que ces caractéristiques ne sont pas modifiées au cours d'une étude sur 90 jours. Les caractéristiques du sperme ne sont évaluées que chez les mâles de la cohorte 1A.
57. Au moment du sacrifice, on note le poids des testicules et des épидидymes de tous les mâles P et F1 (cohorte 1A). On conserve au moins un testicule et un épидидyme pour l'examen histopathologique. L'épididyme non conservé sert à la numération des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme (16) (17). Les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (ou du canal déférent) sont par ailleurs récupérés d'une manière qui perturbe le moins possible l'évaluation de leur motilité et de leur morphologie (18).
58. La motilité des spermatozoïdes est évaluée immédiatement après le sacrifice ou enregistrée en vidéo en vue d'une analyse ultérieure. Le pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles peut être déterminé subjectivement ou objectivement grâce une analyse du mouvement assistée par ordinateur (19) (20) (21) (22) (23) (24). On conduira l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes à partir d'échantillons de sperme prélevés dans l'épididyme (ou le canal déférent) sous forme de préparations fixées ou en milieu humide (25). Au moins 200 spermatozoïdes par échantillon sont classés comme normaux (aussi bien la tête que la pièce intermédiaire et le flagelle paraissent normaux) ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées (26). Des têtes déformées ou larges peuvent indiquer des anomalies de la spermiation.
59. Si les échantillons de sperme sont congelés, les frottis fixés et les images de la motilité des spermatozoïdes enregistrées au moment de la nécropsie (27), les analyses ultérieures peuvent ne porter que sur les mâles ayant reçu des doses élevées et sur les mâles témoins. Toutefois, si l'on observe des effets liés au traitement, il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles.

▼ **M5****Nécropsie macroscopique**

60. Juste après le sacrifice ou le décès en cours d'étude, tous les animaux P et F1 subissent une nécropsie macroscopique destinée à mettre en évidence d'éventuelles anomalies structurelles ou altérations pathologiques. Il faut prêter une attention particulière aux organes de l'appareil reproducteur. Il convient de consigner les petits moribonds qui ont été euthanasiés et les petits morts et, s'ils ne sont pas macérés, de les examiner pour détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de leur mort, et de les conserver.
61. Un frottis vaginal des femelles P et F1 adultes sera examiné le jour de la nécropsie pour déterminer le stade du cycle œstral et permettre d'établir des corrélations avec l'histopathologie des organes reproducteurs. On examinera les utérus de toutes les femelles P (et F1, le cas échéant) sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

Pesée des organes et conservation des tissus — Animaux adultes P et F1

62. Après le sacrifice, le poids corporel et le poids des organes énumérés ci-dessous de tous les animaux P et F1 adultes des cohortes concernées (voir ci-après) sont déterminés dès que possible après dissection pour éviter toute dessiccation. Il convient de préserver ensuite ces organes dans des conditions appropriées. Sauf mention contraire, les organes qui vont par paires peuvent être pesés individuellement ou ensemble, conformément aux habitudes du laboratoire.
- Utérus (dont oviductes et col), ovaires
 - Testicules, épидидymes (totalité et queue pour les échantillons servant à la numération des spermatozoïdes)
 - Prostate (ensemble des parties dorsolatérale et ventrale). Il convient d'extraire très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate pour éviter de percer les vésicules séminales remplies de liquide. Si le traitement a eu un effet sur le poids total de la prostate, on disséquera minutieusement les lobes dorsolatéral et ventral après les avoir fixés et pesés séparément.
 - Vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides (considérés comme une unité et pesés ensemble)
 - Cerveau, foie, reins, cœur, rate, thymus, hypophyse, glande thyroïde (après fixation), glandes surrénales et organes ou tissus cibles connus.
63. Outre les organes mentionnés ci-dessus, on conservera, dans des conditions appropriées, des échantillons de nerf périphérique, muscle, colonne vertébrale, œil avec nerf optique, conduit gastro-intestinal, vessie, poumon, trachée (portant encore les glandes thyroïde et parathyroïdes), moelle osseuse, canal déférent (mâles), glandes mammaires (mâles et femelles) et vagin.
64. Tous les organes des animaux de la cohorte 1A sont pesés et conservés en vue de l'examen histopathologique.
65. Pour rechercher les effets immunotoxiques pré- et postnataux, 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 1A issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée; chaque portée représentée par au moins 1 petit; sélection au hasard) seront soumis aux examens suivants au moment du sacrifice:
- pesée des ganglions lymphatiques associés ou non à la voie d'exposition (en plus de la pesée des glandes surrénales, du thymus et de la rate, déjà effectuée pour tous les animaux de la cohorte 1A),

▼ **M5**

- analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques (lymphocytes T CD4+ et CD8+, lymphocytes B, et cellules tueuses naturelles NK) effectuée sur la moitié de la rate, l'autre moitié étant conservée en vue de l'examen histopathologique.

L'analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques chez les animaux non immunisés (cohorte 1A) déterminera si l'exposition contribue à une modification de l'équilibre immunologique concernant la distribution des lymphocytes thymiques «auxiliaires» (CD4+) ou cytotoxiques (CD8+) ou des cellules tueuses naturelles (NK) (réponses rapides aux cellules néoplastiques et aux pathogènes).

66. Il convient de peser les organes suivants des animaux de la cohorte 1B et de traiter leurs tissus jusqu'à leur transformation en blocs:

- Vagin (non pesé)
- Utérus (dont col)
- Ovaires
- Testicules (au moins un)
- Épididymes
- Vésicules séminales et glandes coagulantes
- Prostate
- Hypophyse
- Organes cibles connus

L'examen histopathologique de la cohorte 1B ne sera conduit que si les résultats de la cohorte 1A sont équivoques ou que la substance administrée est présumée toxique pour la reproduction ou le système endocrinien.

67. Cohortes 2A et 2B: essai de neurotoxicité pour le développement (JPN 21 ou 22 et descendants adultes). Les animaux de la cohorte 2A sont sacrifiés après l'essai comportemental; leur cerveau est ensuite pesé et soumis à un examen neurohistopathologique complet à des fins d'évaluation de la neurotoxicité. Les animaux de la cohorte 2B sont sacrifiés au JPN 21 ou 22; leur cerveau est ensuite pesé et soumis à un examen microscopique pour évaluer la neurotoxicité. La fixation par perfusion est indispensable pour les animaux de la cohorte 2A et facultative pour ceux de la cohorte 2B, conformément à la méthode d'essai B.53 de l'OCDE (35).

Pesée des organes et conservation des tissus — Animaux F1 juste sevrés

68. Les petits non sélectionnés pour les cohortes, y compris les individus chétifs, sont sacrifiés après le sevrage, au JPN 22, sauf si les résultats indiquent que d'autres recherches *in vivo* s'imposent. Les petits euthanasiés sont soumis à une nécropsie macroscopique comprenant l'évaluation des organes reproducteurs, conformément aux paragraphes 62 et 63. Le cerveau, la rate et le thymus sont pesés et conservés dans des conditions appropriées pour un nombre maximal de 10 petits par sexe et par groupe, issus d'autant de portées que possible. De plus, on pourra conserver les tissus mammaires de ces petits mâles et femelles en vue d'analyses microscopiques supplémentaires⁽¹⁾ [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)]. On conservera également les anomalies macroscopiques et les tissus cibles en vue d'un éventuel examen histologique.

⁽¹⁾ Les recherches ont démontré que la glande mammaire, en particulier dans ses premiers stades de développement, constitue un critère d'évaluation valide de l'action œstrogénique. On recommande donc d'inclure dans la présente méthode d'essai, après validation, des paramètres d'évaluation fondés sur les glandes mammaires des petits des deux sexes.

▼ **M5****Histopathologie — Animaux P**

69. Un examen histopathologique complet des organes énumérés aux paragraphes 62 et 63 est pratiqué sur l'ensemble des animaux P témoins ou ayant reçu une dose élevée. Il convient aussi d'examiner les organes qui présentent des modifications imputables à la substance d'essai chez tous les animaux traités avec des doses inférieures en vue de définir une CSENO. En outre, un examen histopathologique des organes reproducteurs et de toutes les lésions macroscopiques sera pratiqué sur tous les individus 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 œstral ou le nombre, la motilité ou la morphologie des spermatozoïdes ont été affectés.

Histopathologie — Animaux F1*Animaux de la cohorte 1*

70. Un examen histopathologique complet des organes énumérés aux paragraphes 62 et 63 est pratiqué sur l'ensemble des animaux adultes de la cohorte 1A témoins ou ayant reçu une dose élevée. Chaque portée est représentée par au moins un petit de chaque sexe. Il convient aussi d'examiner les organes et les tissus qui présentent des modifications imputables au traitement, ainsi que toutes les lésions macroscopiques, chez tous les animaux traités aux doses inférieures en vue de déterminer une CSENO. L'évaluation des effets pré- et postnataux sur les ganglions lymphatiques requiert un examen histopathologique des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse pratiqué sur 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 1A, en plus de l'examen histopathologique du thymus, de la rate et des glandes surrénales déjà effectué sur tous les animaux 1A.
71. Les tissus reproducteurs et endocriniens de l'ensemble des individus de la cohorte 1B sont traités pour être transformés en blocs. Comme mentionné au paragraphe 66, les organes reproducteurs et endocriniens des animaux de la cohorte 1B subissent un examen histopathologique en cas de suspicion de toxicité pour la reproduction ou le système endocrinien. Il convient aussi de soumettre la cohorte 1B à un examen histologique si les résultats de la cohorte 1A sont équivoques.
72. Les ovaires des femelles adultes doivent contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance, ainsi que les grands corps jaunes; l'examen histopathologique des femelles F1 vise donc à quantifier les follicules primordiaux, les petits follicules en croissance et les grands corps jaunes; il convient que le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de section soient statistiquement appropriés à la méthode d'évaluation employée. Il est possible de procéder d'abord à la numération folliculaire des animaux témoins et traités à la dose élevée; si l'examen de ces derniers révèle un effet nocif, on étendra l'évaluation aux individus ayant reçu les doses inférieures. L'examen inclut la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, à des fins de comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)]. L'évaluation des grands corps jaunes s'effectue parallèlement à l'essai de cyclicité œstrale de sorte que l'étape du cycle puisse être prise en compte. On vérifiera le développement spécifique correct des oviductes, de l'utérus et du vagin.
73. Un examen histopathologique détaillé des testicules sera pratiqué sur les mâles F1 afin de mettre en évidence des effets liés au traitement sur la différenciation et le développement des testicules, et sur la spermatogenèse (38). Quand c'est possible, des coupes du rete testis seront examinées. On vérifiera le développement spécifique normal de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme ainsi que du canal déférent, et on évaluera les paramètres requis pour les mâles P.

▼ **M5***Animaux de la cohorte 2*

74. Un examen neurohistopathologique est pratiqué sur tous les animaux de la cohorte 2A témoins et traités à dose élevée, par sexe, juste après le test neurocomportemental (après le JPN 75, mais pas au-delà du JPN 90). L'examen histopathologique du cerveau est effectué sur tous les animaux de la cohorte 2B témoins et traités à dose élevée, par sexe, au JPN 21 ou 22. Il convient aussi d'examiner les organes ou tissus qui présentent des modifications imputables à la substance d'essai chez les animaux traités avec des doses inférieures en vue de déterminer une CSENO. Pour les animaux des cohortes 2A et 2B, plusieurs coupes du cerveau sont réalisées afin d'examiner les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe, les ganglions de la base, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale (tectum, tegmentum et pédoncules cérébraux), le tronc cérébral et le cervelet. Seule la cohorte 2A subira par ailleurs un examen des yeux (rétine et nerf optique) et d'échantillons de nerf périphérique, muscle et colonne vertébrale. Tous les protocoles neurohistologiques sont conformes à la méthode d'essai B.53 (35).
75. Des parties représentatives du cerveau (coupes homologues soigneusement sélectionnées grâce à des repères microscopiques fiables) seront soumises à un examen morphométrique (quantitatif), qui pourra inclure des mesures linéaires et/ou surfaciques de régions spécifiques du cerveau. On réalisera au moins trois coupes consécutives pour chaque repère morphologique (niveau) en vue de sélectionner ensuite la coupe la plus homologue et représentative de la région spécifique du cerveau à analyser. Les neuropathologistes devront juger si les coupes préparées pour les mesures sont homologues aux autres échantillons du lot et si elles peuvent donc être examinées, dans la mesure où les mesures linéaires, en particulier, sont susceptibles de changer sur une distance relativement faible (28). Les coupes jugées non homologues sont exclues. L'objectif est de prélever des échantillons sur tous les animaux réservés à cet effet (10/sexe/niveau de dose), mais un nombre inférieur demeure acceptable. Toutefois, des échantillons prélevés sur moins de 6 animaux/sexe/niveau de dose ne seront en principe pas considérés comme suffisants pour répondre aux objectifs de la présente méthode d'essai. La stéréologie peut permettre d'identifier des effets liés au traitement sur des paramètres tels que le volume ou le nombre de cellules de régions neuroanatomiques spécifiques. Tous les aspects de la préparation des échantillons de tissus, depuis la fixation de tissus jusqu'à la dissection des échantillons de tissus, au traitement des tissus et à la coloration des lames, devront se conformer à un modèle expérimental équilibré tel que chaque lot contienne des échantillons représentatifs de chaque groupe de dose. En cas de recours aux analyses morphométriques ou stéréologiques, les tissus cérébraux sont inclus dans un milieu approprié, simultanément pour toutes les doses, afin d'éviter les artefacts de rétrécissement associés à un stockage prolongé dans le fixateur.

RAPPORT**Résultats**

76. Les résultats sont rapportés individuellement et résumés sous forme de tableaux. S'il y a lieu, on présentera les informations suivantes pour chaque groupe d'essai et chaque génération: nombre d'animaux présents au début de l'essai, nombre d'animaux décédés durant l'essai ou euthanasiés, moment du décès ou de l'euthanasie, nombre d'animaux fertiles, nombre de femelles gravides, nombre de femelles donnant naissance à une portée, et nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité. Le rapport contient aussi une description de la toxicité, y compris le moment d'apparition des effets toxiques, leur durée et leur sévérité.
77. On évaluera les résultats numériques à l'aide d'une méthode statistique appropriée et acceptée. Les méthodes statistiques font partie intégrante de la méthodologie de l'essai et sont choisies comme telles; elles traitent de façon pertinente les données non normales (par exemple les résultats des numérations), les données tronquées (par exemple en raison d'un temps

▼ **M5**

d'observation limitée), la non-indépendance (par exemple les effets sur les portées et les mesures répétées) et les variances inégales. Les modèles linéaires généralisés mixtes et les modèles dose-effet couvrent un large éventail d'outils d'analyse qui peuvent convenir au traitement des résultats dans le cadre de la présente méthode d'essai. Le rapport fournit suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puissent évaluer/réévaluer l'analyse.

Évaluation des résultats

78. Les résultats sont évalués en fonction des effets observés, notamment à la nécropsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation porte notamment sur la relation ou l'absence de relation entre la dose et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment des lésions macroscopiques. Elle porte aussi sur les organes cibles, la fertilité, les anomalies cliniques, la capacité reproductrice et les portées, les modifications du poids corporel, la mortalité et autres effets toxiques et affectant le développement. Les modifications spécifiques à chaque sexe font l'objet d'une attention particulière. Les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques, y compris le transfert dans le placenta et l'excrétion dans le lait, sont prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

Rapport d'essai

79. Le rapport d'essai comporte les informations énumérées ci-après, obtenues dans la présente étude à partir des animaux P, F1 et F2 (le cas échéant):

Substance d'essai

- Toutes les informations pertinentes disponibles concernant la substance d'essai et ses propriétés toxicocinétiques et toxicodynamiques
- Données d'identification
- Pureté

Véhicule (s'il y a lieu)

- Justification du choix du véhicule s'il ne s'agit pas d'eau

Animaux d'essai

- Espèces/souches utilisées
- Nombre, âge et sexe
- Source, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc.
- Poids de chaque animal au début de l'essai
- Résultats des frottis vaginaux des femelles P avant le début du traitement (si ces examens ont été pratiqués à ce moment-là)
- Données sur l'accouplement de la génération P, précisant les partenaires mâles et femelles du couple, et le succès de l'accouplement
- Portée d'origine des adultes de la génération F1

Conditions d'essai

- Justification de la sélection des doses appliquée
- Détails concernant la préparation de la substance d'essai ou son incorporation aux aliments, ainsi que la concentration obtenue

▼ **M5**

- Stabilité et homogénéité de la préparation dans le véhicule ou le milieu d'administration (par exemple la nourriture, l'eau de boisson), dans le sang et/ou le lait, dans les conditions d'utilisation et de stockage entre les utilisations
- 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 des aliments et de l'eau (y compris la composition de la nourriture, si possible)
- Description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, et pour affecter les petits aux groupes d'essai
- Conditions environnementales
- Liste du personnel impliqué dans l'étude, mentionnant leur formation professionnelle

Résultats (récapitulatif et données individuelles par sexe et par dose)

- Consommation de nourriture, consommation d'eau (si disponible), efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme de nourriture consommé, sauf lors de la cohabitation et de l'allaitement), et consommation de la substance d'essai (en cas d'administration dans la nourriture/l'eau de boisson) pour les animaux P et F1
- Données relatives à l'absorption (si disponibles)
- Poids corporel des animaux P
- Poids corporel des animaux F1 sélectionnés juste après le sevrage
- Temps de survie pendant l'étude ou indication de la survie des animaux à la fin de l'expérience
- Nature, sévérité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non)
- Résultats des analyses hématologique, d'urine et de chimie clinique, y compris dosage des TSH et T4
- Analyse phénotypique des cellules spléniques (lymphocytes T, B, cellules NK)
- Cellularité de la moelle osseuse
- Données sur les effets toxiques
- Nombre de femelles P et F1 présentant une durée de cycle ou un cycle œstral normal ou anormal
- Moment de la copulation (intervalle précoïtal, soit nombre de jours entre l'accouplement et la copulation)
- Effets toxiques ou autres sur la reproduction, y compris nombre et pourcentage d'animaux qui ont copulé, sont gravides, ont mis bas et allaité, de mâles déclenchant une gravidité, de femelles présentant des signes de dystocie ou de mise bas prolongée ou difficile
- Durée de la gestation et, lorsque c'est possible, de la parturition
- Nombre d'implantations, taille de la portée et pourcentage de petits mâles
- Nombre et pourcentage de pertes postimplantation, de naissances vivantes et de mort-nés

▼ **M5**

- Poids des portées et poids des petits (mâles, femelles et poids global), nombre d'individus chétifs, s'il est établi
- Nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques
- Effets toxiques ou autres sur la descendance, la croissance postnatale, la viabilité, etc.
- Repères physiques relevés sur les petits et autres données sur le développement postnatal
- Informations relatives à la maturité sexuelle des animaux F1
- Observations fonctionnelles réalisées selon les besoins sur les petits et les adultes
- Poids corporel au moment du sacrifice, et poids absolu et relatif des organes des adultes P et F1
- Résultats de la nécropsie
- Description détaillée de toutes les observations histopathologiques
- Nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles, pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale, et pourcentage de spermatozoïdes correspondant à chaque anomalie identifiée pour les mâles P et F1
- Nombre et stades de maturation des follicules contenus dans les ovaires des femelles P et F1, le cas échéant
- Numération des grands corps jaunes dans les ovaires des femelles F1
- Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Paramètres de la cohorte 2

- Description détaillée des protocoles utilisés pour standardiser les observations et les protocoles, et définitions du mode opératoire de notation des observations
- Liste de tous les protocoles d'essai utilisés, et justification de leur choix
- Précisions sur les protocoles comportementaux/fonctionnels, neuropathologiques et morphométriques utilisés, y compris informations et détails concernant les appareils automatisés
- Protocoles d'étalonnage et de vérification de l'équivalence des appareils et de la répartition équilibrée des groupes de traitement dans les protocoles d'essai
- Brève justification explicitant les éventuelles décisions impliquant une appréciation professionnelle
- Description détaillée de toutes les observations comportementales/fonctionnelles, neuropathologiques et morphométriques par sexe et par groupe de dose, y compris augmentations et diminutions par rapport aux témoins
- Poids du cerveau
- Tout diagnostic, réalisé sur la base de signes et de lésions neurologiques, y compris maladies ou affections d'origine naturelle
- Images d'observations représentatives
- Images à faible grossissement permettant d'évaluer l'homologie des coupes utilisées pour la morphométrie

▼ **M5**

- Traitement statistique des résultats, notamment modèles statistiques employés pour analyser les données, et résultats, qu'ils soient significatifs ou non
- Lien entre chaque effet toxique et la conclusion proposée sur le potentiel neurotoxique de la substance d'essai, par sexe et par groupe de dose
- Répercussions de toutes les informations toxicocinétiques sur les conclusions
- Données démontrant la fiabilité et la sensibilité de la méthode de l'essai (c'est-à-dire, résultats des témoins positifs et historiques)
- Relations éventuelles entre les effets neuropathologiques et fonctionnels
- CSENO ou dose de référence pour les mères et les petits, par sexe et groupe de dose
- Discussion sur l'interprétation générale des données sur la base des résultats, dont une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une neurotoxicité pour le développement, et précisant la CSENO

Paramètres de la cohorte 3

- Concentration sérique des anticorps IgM (sensibilisation avec GRM ou KLH), ou nombre de CFP dans la rate en réponse aux IgM (sensibilisation avec GRM)
- Confirmation de la performance de l'essai de réponse anticorps dépendante des lymphocytes T dans le cadre du processus d'optimisation par le laboratoire qui conduit l'essai pour la première fois, puis périodiquement (par exemple tous les ans) par l'ensemble des laboratoires
- Discussion sur l'interprétation générale des données sur la base des résultats, dont une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une immunotoxicité pour le développement, et précisant la CSENO

*Discussion des résultats**Conclusions, y compris CSENO concernant les parents et les descendants*

Toutes les informations ne résultant pas de l'étude mais utiles pour interpréter les résultats (par exemple similitude des effets avec ceux d'autres neurotoxiques connus), sont également fournies.

Interprétation des résultats

80. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance chimique durant toutes les phases du cycle de reproduction, si besoin est. Elle livre notamment des informations sur l'appareil reproducteur et sur divers paramètres d'évaluation des effets sur le développement, la croissance, la survie et les fonctions des descendants jusqu'au JPN 90.
81. L'interprétation des résultats de cette étude tient compte de toutes les informations disponibles sur la substance chimique, notamment ses propriétés physico-chimiques, toxicocinétiques et toxicodynamiques, les données pertinentes disponibles sur les analogues de structure et les résultats des études de toxicité antérieures sur la substance d'essai (par exemple toxicité aiguë, toxicité après application répétée, études mécanistiques et études visant à repérer d'éventuelles différences qualitatives et quantitatives des propriétés métaboliques in vivo/in vitro d'une espèce à une autre). Il convient, si possible, d'interpréter les résultats de la nécropsie macroscopique et de la pesée des organes à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées. On pourra éventuellement expliquer le ralentissement de la croissance des descendants par une influence de la substance d'essai sur la composition du lait (29).

▼ **M5***Cohorte 2 (neurotoxicité pour le développement)*

82. Les résultats des évaluations neurocomportementales et neuropathologiques sont interprétés à la lumière de tous les effets observés, selon une démarche fondée sur le poids de la preuve et le jugement d'experts. Il convient d'inclure dans la discussion les types d'effets comportementaux ou morphologiques éventuellement observés, ainsi que les preuves d'une relation dose-effet. Cette caractérisation devra englober l'évaluation de la neurotoxicité pour le développement, provenant notamment d'études épidémiologiques sur l'homme ou de rapports d'études de cas et d'études animales expérimentales (par exemple données toxicocinétiques, informations sur la relation structure-activité, données issues d'autres études de toxicité). L'évaluation des résultats comprendra une discussion analysant la signification biologique et la signification statistique. Elle inclura, le cas échéant, la relation entre les altérations neuropathologiques et comportementales observées. Pour orienter l'interprétation des résultats relatifs à la neurotoxicité pour le développement, voir la méthode d'essai B.53 de l'OCDE (35) et l'article de Tyl e.a. de 2008 (31).

Cohorte 3 (immunotoxicité pour le développement)

83. La suppression ou la stimulation de la fonction immunitaire évaluée par l'essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T est interprétée à la lumière de l'ensemble des observations effectuées. La signification des résultats de cet essai pourrait être appuyée par d'autres effets sur divers indicateurs associés aux facteurs immunologiques (comme la cellularité de la moelle osseuse, le poids et l'histopathologie des tissus lymphoïdes, la distribution des sous-populations lymphocytaires). Les effets mis en évidence par l'essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T sont susceptibles d'être moins significatifs quand d'autres toxicités se manifestent à des concentrations d'exposition inférieures.
84. Pour l'interprétation des résultats des études de la toxicité pour la reproduction et de la neurotoxicité, il est recommandé de consulter le document d'orientation n° 43 de l'OCDE (26).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Cooper, R.L., Lamb, J.C., Barlow, S.M., Bentley, K., Brady, A.M., Doerr, N., Eisenbrandt, D.L., Fenner-Crisp, P.A., Hines, R.N., Irvine, L.F.H., Kimmel, C.A., Koeter, H., Li, A.A., Makris, S.L., Sheets, L.P., Speijers, G.J.A., et Whitby, K.E. (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.
- (2) Thigpen, J.E., Setchell, K.D.R., Ahlmark, K.B., Locklear, J., Spahr, T., Leviness, G.F., Goelz, M.F., Haseman, J.K., Newbold, R.R., et Forsythe, D.B. (1999), 'Phytöestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530-536.
- (3) Zoetis, T., et Walls, I. (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington DC.
- (4) Moser, V.C., Walls, I., et Zoetis, T. (2005), 'Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., Beck, B.D., et Goodman, J.I. (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B., et Palmer, A.K. (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., Buschmann, J., et Orthen, B. (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼ M5

- (8) Sakai, T., Takahashi, M., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Kawashima, K., Mayahara, H., et Ohno, Y. (2000), 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M., et Cooper, R.L. (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research, Part B*, 80(2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in Auston, C.R., et Short, R.V. (eds), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., et Reynolds, V.L. (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13:383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., et Weiner, R.I. (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., Gower, J., Kurali, E., Sui, J.L., Bynum, J., Ennulat, D., et Herzyk, D.J. (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., Ostby, J., Ferrell, J., Rehnberg, G., Linder, R., Cooper, R., Goldman, J., Slott, V., et Laskey, J. (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., Amann, R.P., et Killian, G.J. (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., Gray, L.E. Jr, et Suarez, J.D. (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat', *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal, L.A., Foote, R.H., Hurtt, M.E., Klinefelter, G.R., Makris, S.L., Perreault, S.D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K.A., Veeramachaneni, D.N., et Wise, L.D. (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237-244.
- (20) Chapin, R.E., Filler, R.S., Gulati, D., Heindel, J.J., Katz, D.F., Mebus, C.A., Obasaju, F., Perreault, S.D., Russell, S.R., et Schrader, S. (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., Roberts, N.L., et Suarez, J.D. (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409-421.
- (22) Slott, V.L., Suarez, J.D., et Perreault, S.D. (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼ M5

- (23) Slott, V.L., et Perreault, S.D. (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. p. 319-333.
- (24) Toth, G.P., Stober, J.A., Read, E.J., Zenick, H., et Smith, M.K. (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
- (25) Linder, R.E., Strader, L.F., Slott, V.L., et Suarez, J.D. (1992), 'Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
- (26) OCDE (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16*, OCDE, Paris.
- (27) Working, P.K., et Hurtt, M. (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
- (28) Bolin, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
- (29) Stütz, N., Bongiovanni, B., Rassetto, M., Ferri, A., Evangelista de Duffard, A.M., et Duffard, R. (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
- (30) Thigpen, JE, Setchell, K.D.R., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Caviness, G.F., Kissling, G.E., Grant, M.G., et Forsythe, D.B. (2007), 'Variations in Phytosterogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental Health Perspectives*, 115(12), 1717-1726.
- (31) Tyl, R.W., Croffon, K., Moretto, A., Moser, V., Sheets, L.P., et Sobotka, T.J. (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30:349-381.
- (32) OCDE (1996), *Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement, Ligne directrice n° 422 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*, OCDE, Paris.
- (33) Chapitre B.43 de la présente annexe, «Étude de neurotoxicité sur les rongeurs».
- (34) OCDE (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7*, OECD, Paris.
- (35) Chapitre B.53 de la présente annexe, «Étude de neurotoxicité pour le développement».
- (36) Chapitre B.54 de la présente annexe, «Bioessai utéro-trophique chez les rongeurs: essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques».
- (37) Chapitre B.55 de la présente annexe, «Bioessai de Hershberger sur le rat: essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques».

▼ M5

- (38) OCDE (2009), Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OCDE, Paris.
- (39) OCDE (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.
- (40) OCDE (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OCDE, Paris.

▼ **M5***Appendice 1***Mesures et observations incluses dans la batterie d'observations fonctionnelles (cohorte 2A)**

Cage d'hébergement et plan ouvert	Manipulation	Physiologie
Posture	Facilité à saisir	Température
Mouvements spasmodiques et contractures involontaires	Facilité à manipuler	Poids corporel
Fermeture palpébrale	Tonicité musculaire	Réflexe pupillaire
Piloérection	Réponse à l'approche	Taille de la pupille
Salivation	Réponse au toucher	
Larmolement	Réponse auditive	
Vocalisations	Réponse au pincement de la queue	
Cabrage	Réflexe de redressement	
Démarche anormale	Étalement du pied posé sur le sol	
Éveil	Force de préhension des pattes antérieures	
Stéréotypie	Force de préhension des pattes postérieures	
Comportement bizarre		
Taches		
Respiration anormale		

▼ **M5**

Appendice 2

DÉFINITIONS

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼ **M5****B.57. ESSAI DE STÉROÏDOGENÈSE H295R**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 456 (2011) de l'OCDE. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à en établir de nouvelles concernant le dépistage et l'essai des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbateurs endocriniens» de 2002 comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré de complexité biologique différent (1). L'essai de stéroïdogénèse H295R in vitro (H295R) décrit dans la présente méthode d'essai utilise une lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain (cellules NCI-H295R) et constitue un «essai in vitro fournissant des données mécanistiques» de niveau 2, à des fins de détection et de hiérarchisation. Le développement et la normalisation de l'essai en tant que détecteur des effets des substances chimiques sur la stéroïdogénèse, et en particulier la production de 17 β -estradiol (E2) et de testostérone (T), ont été réalisés en plusieurs étapes. L'essai H295R a été optimisé et validé (2) (3) (4) (5).
2. L'essai de stéroïdogénèse H295R a pour but de détecter les substances chimiques qui influent sur la production d'E2 et de T. Il vise à identifier les xénobiotiques qui ont pour site(s) cible(s) les composantes endogènes constituant la voie biochimique intracellulaire qui conduit, par une suite de réactions, du cholestérol à la production d'E2 et/ou de T. L'essai H295R ne vise pas à identifier les substances qui influent sur la stéroïdogénèse en raison de leurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HHG). Il a pour but d'indiquer si, oui ou non, une substance chimique est susceptible d'induire ou d'inhiber la production de T et d'E2; il est toutefois possible d'obtenir des résultats quantitatifs dans certains cas (voir paragraphes 53 et 54). Les résultats de l'essai s'expriment par des changements relatifs de la production hormonale par comparaison avec les témoins solvant (TS). L'essai ne vise pas à fournir des informations mécanistiques spécifiques concernant l'interaction de la substance d'essai avec le système endocrinien. Des recherches ont été conduites au moyen de la lignée cellulaire afin de déterminer les effets sur des enzymes et des hormones intermédiaires particulières comme la progestérone (2).
3. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont présentées à l'appendice. Un protocole détaillé comprenant des instructions sur la façon de préparer les solutions, de cultiver les cellules et d'effectuer divers aspects de l'essai est présenté dans les appendices I à III du document Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production de l'OCDE (4).

CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

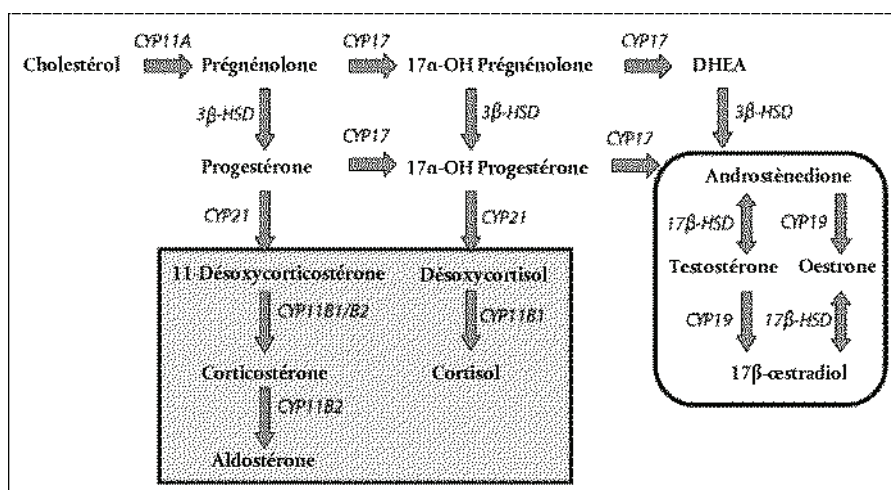
4. Cinq enzymes différentes catalysant six réactions différentes interviennent dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes sexuelles. La conversion enzymatique du cholestérol en prégnénolone par l'enzyme de coupure de la chaîne latérale du cholestérol (CYP11A) liée au cytochrome P450 (CYP) constitue l'étape initiale d'une série de réactions biochimiques qui aboutissent à la synthèse des hormones stéroïdiennes finales. Selon l'ordre des deux réactions suivantes, la stéroïdogénèse se divise en deux voies, la voie Δ^5 -hydroxystéroïde et la voie Δ^4 -cétostéroïde, qui convergent dans la production d'androstènedione (figure 1).
5. L'androstènedione est convertie en testostérone (T) par la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD). La testostérone est à la fois une hormone intermédiaire et une hormone finale. Chez les sujets masculins, la T peut être convertie en dihydrotestostérone (DHT) par la 5 α -réductase, qui se trouve dans les membranes cellulaires, l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique de tissus cibles de l'action androgénique comme la prostate et les vésicules séminales. La DHT est un androgène nettement plus puissant que la T et elle est aussi considérée comme une hormone finale. L'essai H295R ne mesure pas la DHT (voir paragraphe 10).

▼ M5

6. L'enzyme de la voie stéroïdogénique qui convertit les substances androgéniques en substances œstrogéniques est l'aromatase (CYP19). La CYP19 convertit la T en 17 β -œstradiol (E2) et l'androstènedione en œstrone. L'E2 et la T sont considérés comme des hormones finales de la voie stéroïdogénique.
7. La spécificité de l'activité de lyase de la CYP17 diffère entre les espèces pour les substrats intermédiaires. Chez l'homme, l'enzyme favorise les substrats de la voie Δ^5 -hydroxystéroïde (prégnénolone), alors que les substrats de la voie Δ^4 -cétostéroïde (progestérone) sont favorisés chez le rat (19). Ces différences dans l'activité de lyase de la CYP17 expliquent peut-être certaines différences entre les espèces dans la réponse aux substances qui altèrent la stéroïdogénèse in vivo (6). Les cellules H295 ont montré qu'elles reflétaient très fidèlement l'expression de l'enzyme surrénalienne chez l'homme adulte et le schéma de production de stéroïdes (20), mais on sait qu'elles expriment les enzymes des voies Δ^5 -hydroxystéroïde et Δ^4 -cétostéroïde pour la synthèse des androgènes (7) (11) (13) (15).

Figure 1

Voie stéroïdogénique dans les cellules H295R



Note:

Les enzymes sont en italique, les hormones en gras et les flèches indiquent la direction de la synthèse. Le fond grisé indique les voies/produits de la catégorie des corticostéroïdes. Les voies/produits de la catégorie des stéroïdes sexuels sont entourés d'une courbe. CYP = cytochrome P450; HSD = hydroxystéroïde déshydrogénase; DHEA = déhydroépiandrostérone.

8. La lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain est un modèle in vitro utile pour l'étude des effets sur la synthèse des hormones stéroïdes (2) (7) (8) (9) (10). La lignée cellulaire H295R exprime les gènes qui codent toutes les enzymes clés pour la stéroïdogénèse mentionnées ci-dessus (11) (15) (figure 1). C'est là une propriété unique car l'expression in vivo de ces gènes est spécifique au tissu et au stade de développement: typiquement, aucun tissu ou stade de développement n'exprime à lui seul tous les gènes intervenant dans la stéroïdogénèse (2). Les cellules H295R ont les caractéristiques physiologiques de cellules surrénaliennes fœtales humaines zonalement indifférenciées (11). Ces cellules représentent un système in vitro unique en ce qu'elles ont la capacité de produire toutes les hormones stéroïdes qu'on trouve dans le cortex surrénalien adulte et dans les gonades, et permettent de tester les effets sur la synthèse des corticostéroïdes et sur la production d'hormones stéroïdes sexuelles comme les androgènes et œstrogènes, bien que l'essai n'ait été validé que

▼ **M5**

pour la détection de la T et de l'E2. Les changements enregistrés par le système d'essai sous la forme d'une altération de la production de T et d'E2 peuvent être le résultat d'une multitude d'interactions différentes des substances d'essai avec les fonctions stéroïdogéniques exprimées par les cellules H295R. Cela inclut la modulation de l'expression, de la synthèse ou de la fonction des enzymes intervenant dans la production, la transformation ou l'élimination des hormones stéroïdes (12) (13) (14). L'inhibition de la production d'hormones peut être due à une liaison compétitive directe avec une enzyme dans la voie de synthèse, à l'impact sur des cofacteurs comme la NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique), et/ou à l'augmentation du métabolisme des stéroïdes ou la suppression de l'expression génique de certaines enzymes dans la voie de la stéroïdogénèse. Si l'inhibition peut être fonction de processus aussi bien directs qu'indirects intervenant dans la production des hormones, l'induction agit typiquement de manière indirecte, par exemple en touchant des cofacteurs comme la NADPH et l'AMPc (comme dans le cas de la forskoline), en diminuant le métabolisme des stéroïdes (13) et/ou en régulant positivement l'expression des gènes stéroïdogéniques.

9. L'essai H295R présente plusieurs avantages:

- il permet de détecter aussi bien les augmentations que les diminutions de la production de T et d'E2,
- il permet d'apprécier directement l'impact potentiel d'une substance chimique sur la viabilité des cellules/la cytotoxicité. C'est là un trait important qui permet de faire la distinction entre les effets dus à la cytotoxicité et ceux dus à l'interaction directe des produits chimiques avec les voies stéroïdogéniques, ce qui n'est pas possible dans les systèmes d'explants de tissus composés de multiples types de cellules de sensibilité et fonctionnalité variables,
- il ne nécessite pas l'utilisation d'animaux,
- la lignée de cellules H295R est commercialement disponible.

10. Les principales limites de l'essai sont les suivantes:

- sa capacité métabolique est inconnue mais probablement assez limitée; en conséquence, l'essai ne détectera probablement pas les substances qui doivent être métaboliquement activées,
- étant dérivée de tissu surrénal, la H295R possède les enzymes capables de produire aussi bien les hormones glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes que les hormones sexuelles; en conséquence, les effets sur la production de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes peuvent influencer sur les niveaux de T et d'E2 observés dans l'essai,
- il ne mesure pas la DHT et ne permet donc pas de détecter les substances inhibant la 5 α -réductase, auquel cas on peut utiliser l'essai de Hershberger (16),
- l'essai H295R ne détecte pas les substances qui interfèrent avec la stéroïdogénèse en affectant l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (HHG), ce qui ne peut être étudié que chez des animaux intacts.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. L'essai a pour but la détection des substances chimiques qui influent sur la production de T et d'E2. La T est aussi un intermédiaire dans la voie de production de l'E2. L'essai peut détecter les produits chimiques qui inhibent ou induisent typiquement les enzymes de la voie de la stéroïdogénèse.

▼ **M5**

12. L'essai s'effectue habituellement dans des conditions de culture cellulaire standard, sur des plaques de culture à 24 puits. On peut aussi utiliser d'autres tailles de plaque pour réaliser l'essai; toutefois, les conditions d'ensemencement et les conditions expérimentales sont ajustées en conséquence pour maintenir la conformité aux critères de performance.

13. Après une période d'acclimatation de 24 heures dans les plaques de culture multipuits, les cellules sont exposées pendant 48 heures à 7 concentrations de la substance d'essai, au moins en triplicat. Le solvant ainsi qu'un inhibiteur et un inducteur connus de la production des hormones sont employés à une concentration fixe comme témoins négatifs et positifs. À la fin de la période d'exposition, on retire le milieu de chaque puits. Immédiatement après avoir enlevé le milieu, on analyse la viabilité des cellules de chaque puits. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mesurer la concentration des hormones dans le milieu, notamment les trousseaux commerciaux de dosage des hormones ou des techniques instrumentales comme les systèmes combinés de chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (CPL-SM). Les données sont exprimées sous la forme d'un facteur multiplicatif de changement (fold change) par rapport au témoin solvant et d'une concentration minimale avec effet observé (CMEO). Si l'essai est négatif, la plus forte concentration testée est indiquée sous la dénomination de «concentration sans effet observé» (CSEO). Les conclusions concernant la capacité d'une substance chimique d'influer sur la stéroïdogenèse reposent sur au moins deux exécutions de l'essai indépendantes. La première peut servir à déterminer les ordres de grandeur de concentrations avec un ajustement ultérieur de ces concentrations pour les expériences 2 et 3, le cas échéant, si l'on rencontre des problèmes de solubilité ou de cytotoxicité ou si l'activité de la substance chimique semble se situer à l'extrémité de l'intervalle des concentrations testées.

PROCÉDURE DE CULTURE**Lignée de cellules**

14. Les cellules NCI-H295R peuvent être obtenues commercialement auprès de l'ATCC (American Type Culture Collections), après signature d'un contrat de transfert de matériel ⁽¹⁾.

Introduction

15. Étant donné que la capacité de production d'E2 des cellules évolue à mesure que leur âge/le nombre de passages en culture (repiquages) augmente (2), il convient de cultiver les cellules suivant un protocole spécifique avant de les utiliser, et de noter le nombre de passages à partir de la décongélation des cellules ainsi que le numéro du passage auquel les cellules ont été congelées et stockées dans l'azote liquide. Le premier chiffre indique le numéro de passage présent et le second, le numéro du passage auquel les cellules ont été congelées et stockées. Par exemple, des cellules qui ont été congelées après le passage n° 5, et décongelées puis séparées trois fois (4 passages en comptant les cellules juste décongelées comme le passage n° 1) après avoir été remises en culture ont le numéro de passage 4.5. On trouvera à l'appendice I du rapport de validation un exemple de système de numérotation (4).

16. On utilise un milieu-mère comme base pour le milieu supplémenté et le milieu de congélation. Le milieu supplémenté est une composante nécessaire pour cultiver les cellules. Le milieu de congélation est spécifiquement conçu pour permettre une congélation des cellules sans impact pour un stockage de longue durée. Avant utilisation, le Nu-Serum [ou un sérum comparable ayant les mêmes propriétés et dont il a été démontré qu'il produit des données satisfaisant aux exigences de performance de l'essai et au contrôle de qualité (CQ)], qui est un constituant des milieux supplémentés, est analysé pour les concentrations de fond de T et d'E2. La préparation de ces solutions est décrite à l'appendice II du rapport de validation (4).

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, États-Unis (<http://www.lgstandards-atcc.org/>).

▼ M5

17. Après le lancement d'une culture de cellules H295R à partir d'un lot ATCC d'origine, les cellules sont cultivées pour 5 passages (c'est-à-dire qu'elles sont séparées 4 fois). Les cellules du passage 5 sont alors congelées dans l'azote liquide pour stockage. Avant de congeler les cellules, on teste un échantillon des cellules du passage 4 précédent dans une plaque CQ (voir les paragraphes 36 et 37) pour vérifier si la production basale d'hormones et la réponse aux produits témoins positifs satisfont aux critères de CQ de l'essai énoncés dans le tableau 5.

18. Les cellules H295R sont cultivées, congelées et stockées dans l'azote liquide pour qu'il y ait toujours des cellules d'âge ou de passage approprié disponibles pour la culture et l'utilisation. Après la mise en culture d'un lot de cellules nouveau ⁽¹⁾ ou congelé ⁽²⁾, le nombre maximal de passages acceptable pour l'essai H295R ne dépasse pas 10. Par exemple, pour les cultures de cellules à partir d'un lot congelé au passage 5, les numéros de passage acceptables iraient de 4.5 à 10.5 compris. Pour la préparation des cellules à partir de ces lots congelés, la procédure décrite au paragraphe 19 s'applique. Ces cellules sont cultivées pendant au moins quatre (4) passages supplémentaires (passage 4.5) avant d'être utilisées dans le test.

Préparation des cellules à partir du stock congelé

19. La procédure de préparation des cellules à partir du stock congelé est utilisée lorsqu'un nouveau lot de cellules est retiré de l'azote liquide pour être cultivé et testé. L'appendice III du rapport de validation (4) décrit cette procédure en détail. Les cellules sont retirées de l'azote liquide, rapidement décongelées, placées dans un milieu supplémenté dans un tube à centrifuger, centrifugées à température ambiante, remises en suspension dans le milieu supplémenté et transférées dans un flacon de culture. Le milieu est changé le jour suivant. Les cellules H295R sont cultivées dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et le milieu est renouvelé 2 ou 3 fois par semaine. Quand les cellules ont atteint environ 85 à 90 % de confluence, il faut les séparer. Cette séparation est nécessaire pour assurer la santé et la croissance des cellules, et pour les préserver en vue de la réalisation d'essais biologiques. Les cellules sont rincées 3 fois à la solution saline tampon phosphate (PBS, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) et libérées du flacon de culture par l'ajout d'une enzyme de décollement appropriée, par exemple la trypsine, dans la PBS (sans Ca²⁺ ni Mg²⁺). Dès que les cellules se détachent du flacon de culture, il faut stopper l'action de l'enzyme en ajoutant le milieu supplémenté dans une proportion de 3 fois le volume utilisé pour le traitement par l'enzyme. On place les cellules dans un tube de centrifugation, on les centrifuge à température ambiante, on enlève le surnageant et on resuspend le culot de cellules dans le milieu supplémenté. On met la quantité appropriée de solution de cellules dans le nouveau flacon de culture. La quantité de solution de cellules est ajustée de telle sorte que les cellules soient confluentes dans les 5 à 7 jours. Le ratio de sous-culture recommandé est entre 1:3 et 1:4. La plaque est soigneusement étiquetée. Les cellules sont alors prêtes à être utilisées dans l'essai et les cellules en excédent sont congelées dans l'azote liquide comme décrit dans le paragraphe 20.

⁽¹⁾ Un «lot nouveau» est un lot de cellules juste reçu de l'ATCC.

⁽²⁾ Un «lot congelé» correspond à des cellules qui ont été auparavant cultivées puis congelées dans un laboratoire autre que l'ATCC.

▼ **M5****Congélation des cellules H295R (préparation des cellules pour le stockage dans l'azote liquide)**

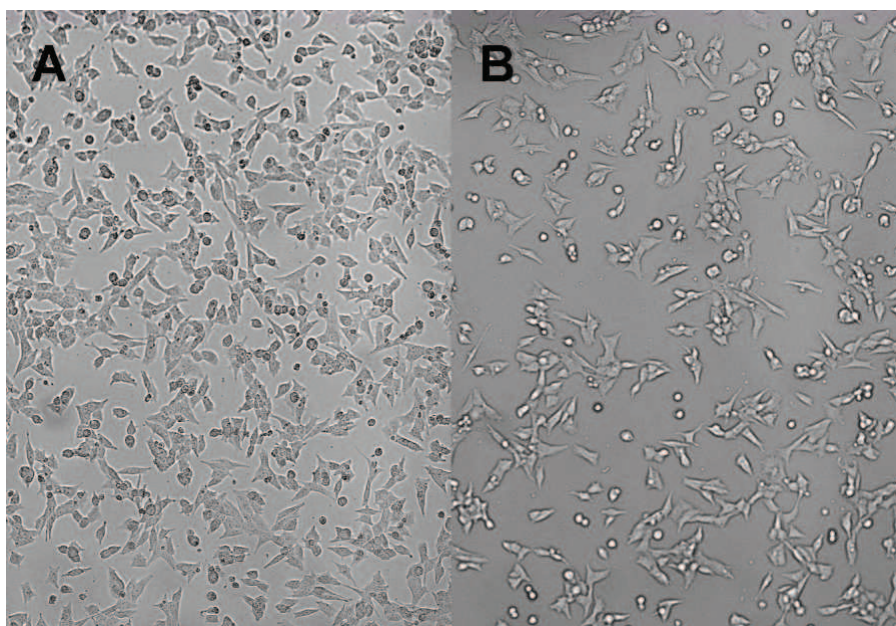
20. Pour préparer les cellules H295R à la congélation, on suit la procédure décrite ci-dessus pour la séparation des cellules jusqu'à l'étape où l'on resuspend le culot de cellules formé au fond du tube de centrifugation. Ici, on resuspend le culot de cellules dans le milieu de congélation. On transfère la solution dans un flacon cryogénique, on l'étiquette convenablement et on la congèle à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures, après quoi le flacon cryogénique est transféré vers l'azote liquide pour stockage. L'appendice III du rapport de validation (4) expose les détails de cette procédure.

Mise en plaque et préincubation des cellules pour les tests

21. Le nombre de plaques de 24 puits, préparées comme indiqué au paragraphe 19, qui sera nécessaire dépend du nombre de produits chimiques à tester et de la confluence des cellules dans les boîtes de culture. En règle générale, un récipient de culture (75 cm^2) à 80-90 % de confluence fournira suffisamment de cellules pour 1 à 1,5 plaque (de 24 puits) à une densité cible de 200 000 à 300 000 cellules par ml de milieu conduisant à une confluence d'environ 50-60 % dans les puits à 24 heures (figure 2). C'est typiquement la densité de cellules optimale pour la production d'hormones dans l'essai. À de plus hautes densités, le profil de production de la T ainsi que de l'E2 est altéré. Avant de réaliser l'essai la première fois, il est recommandé de tester différentes densités entre 200 000 et 300 000 cellules par ml et de choisir pour les expériences ultérieures la densité conduisant à une confluence de 50-60 % dans les puits à 24 heures.

Figure 2

Photomicrographie de cellules H295R à une densité d'ensemencement de 50 % dans une plaque de culture à 24 puits à 24 heures, au bord (A) et au centre (B) d'un puits



22. On retire le milieu du flacon de culture à la pipette et on rince 3 fois les cellules à la PBS stérile (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}). On ajoute une solution d'enzyme (dans la PBS) pour décoller les cellules du flacon de culture. Quand le temps approprié pour le décollement des cellules s'est écoulé, il faut stopper l'action de l'enzyme en ajoutant le milieu supplémenté dans une proportion de 3 fois le volume utilisé pour le traitement par l'enzyme. On place les cellules dans un tube de centrifugation, on les centrifuge à température ambiante, on enlève le surnageant et on resuspend le culot de cellules dans le milieu supplémenté. On calcule la densité de cellules au moyen, par exemple, d'un hémocytomètre ou d'un compteur de cellules. La solution de cellules est diluée à la densité de mise en plaque souhaitée et soigneusement

▼ M5

mélangée pour assurer une densité de cellules homogène. Les cellules sont mises en plaque avec 1 ml de solution de cellules par puits et les plaques et puits sont étiquetés. Les plaquesensemencées sont incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures pour permettre aux cellules d'adhérer aux puits.

EXIGENCES DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

23. Il est essentiel que des volumes exacts de solutions et d'échantillons soient introduits dans les puits pendant le dosage parce que ces volumes déterminent les concentrations utilisées dans les calculs des résultats de l'essai.
24. Avant le début de la culture des cellules et tout test ultérieur, chaque laboratoire démontre la sensibilité de son système de mesure des hormones (paragraphe 29-31).
25. S'il est prévu d'utiliser des systèmes de mesure des hormones à base d'anticorps, il faut analyser les produits chimiques à tester en ce qui concerne leur potentiel d'interférence avec le système de mesure utilisé pour quantifier la T et l'E2, comme indiqué dans le paragraphe 32, avant de commencer les tests.
26. Le DMSO est le solvant recommandé pour cet essai. Si l'on utilise un autre solvant, il faut déterminer:
 - la solubilité de la substance d'essai, de la forskoline et du prochloraz dans le solvant et
 - la cytotoxicité en fonction de la concentration du solvant.

Il est recommandé que la concentration maximale admissible de solvant ne dépasse pas une dilution au dixième de la plus faible concentration cytotoxique du solvant.

27. Avant d'effectuer un test pour la première fois, le laboratoire réalise une expérience de qualification démontrant qu'il est capable d'établir et de maintenir les conditions de culture des cellules et les conditions expérimentales appropriées, requises pour tester les produits chimiques, comme il est décrit aux paragraphes 33 à 35.
28. Quand on commence des tests au moyen d'un lot de cellules nouveau, il faut exécuter un essai sur une plaque de CQ avant l'utilisation du lot afin d'évaluer la performance des cellules, comme il est décrit aux paragraphes 36 et 37.

Performance du système de mesure des hormones

Sensibilité, exactitude, précision de la méthode et réactivité croisée avec la matrice de l'échantillon

29. Chaque laboratoire peut utiliser un système de mesure des hormones de son choix pour l'analyse de la production de T et d'E2 par les cellules H295R dès lors qu'il satisfait aux critères de performance, y compris la limite de quantification (LdQ). En principe, elle est de 100 pg/ml pour la T et de 10 pg/ml pour l'E2, sur la base des niveaux de base d'hormones observés dans les études de validation. Toutefois, des niveaux moindres ou plus élevés peuvent être appropriés suivant les niveaux de base d'hormones atteints dans le laboratoire d'exécution. Avant de tester des plaques de CQ et des produits chimiques, le laboratoire démontre que le système qu'il utilisera peut mesurer les concentrations d'hormones dans le milieu supplémenté avec une exactitude et une précision suffisantes pour satisfaire aux critères de CQ spécifiés dans les tableaux 1 et 5 en analysant le milieu supplémenté

▼ **M5**

dopé par un étalon d'hormone interne. Le milieu supplémenté est dopé par au moins 3 concentrations de chaque hormone (par exemple 100, 500 et 2 500 pg/ml de T; 10, 50 et 250 pg/ml d'E2; ou on peut utiliser, pour les plus basses concentrations de dopage par la T et l'E2, les concentrations les plus faibles possible sur la base des limites de détection du système de mesure des hormones choisi) et analysé. Il convient que les concentrations d'hormone mesurées des échantillons non extraits ne diffèrent pas de plus de 30 % des concentrations nominales, et que les variations entre les mesures répliquées du même échantillon ne dépassent pas 25 % (voir aussi le tableau 8 pour des critères de CQ additionnels). Si ces critères de CQ sont remplis, on admet que le système de mesure des hormones choisi est suffisamment exact et précis et ne comporte pas de réaction croisée avec les composants du milieu (matrice de l'échantillon) susceptible d'influer significativement sur le résultat de l'essai. Dans ce cas, aucune extraction d'échantillons n'est requise avant la mesure des hormones.

30. Dans le cas où les critères de CQ des tableaux 1 et 8 ne sont pas remplis, il peut y avoir un effet de matrice significatif et il faut effectuer une expérience en procédant à une extraction sur le milieu dopé. L'appendice II du rapport de validation (4) présente un exemple de procédure d'extraction. Les mesures des concentrations d'hormones dans les échantillons extraits sont faites en triple ⁽¹⁾. Si l'on peut montrer qu'après extraction les composants du milieu n'interfèrent pas avec la méthode de détection des hormones conformément aux critères de CQ, toutes les expériences ultérieures sont conduites au moyen d'échantillons extraits. Si les critères de CQ ne sont pas satisfaits après extraction, le système de mesure des hormones utilisé n'est pas approprié aux besoins de l'essai de stéroïdogénèse H295R et il faut employer une autre méthode de détection des hormones.

Courbe standard

31. Les concentrations d'hormones des témoins solvant (TS) se situent dans la partie linéaire de la courbe standard. De préférence, les valeurs de TS sont proches du centre de la partie linéaire de manière qu'on puisse mesurer l'induction et l'inhibition de la synthèse des hormones. Les dilutions du milieu (ou des extraits) à mesurer sont choisies en conséquence. La relation linéaire est déterminée par une méthode statistique appropriée.

Test d'interférence des substances chimiques

32. S'il est prévu d'utiliser des essais à base d'anticorps comme les méthodes immunoenzymatiques (ELISA) ou radio-immunologiques (RIA) pour mesurer les hormones, il faut tester chaque substance chimique quant à son interférence potentielle avec le système de mesure des hormones qui doit être employé, avant de commencer à effectuer les essais de substances chimiques elles-mêmes [appendice III du rapport de validation (4)], parce que certaines de ces substances peuvent interférer avec ces tests (17). S'il se produit une interférence ≥ 20 % de la production basale d'hormones pour la T ou l'E2 telle que déterminée par l'analyse des hormones, le «Test d'interférence des substances chimiques avec la mesure des hormones» (décrit dans l'appendice III du rapport de validation (4), section 5.0) est effectué sur toutes les dilutions de solution mère des substances d'essai afin de

⁽¹⁾ Remarque: si l'extraction est nécessaire, on effectue trois mesures répliquées pour chaque extrait. On n'extrait chaque échantillon qu'une seule fois.

▼ **M5**

déterminer la dose seuil à partir de laquelle une interférence significative ($\geq 20\%$) se produit. Si l'interférence est inférieure à 30 %, on peut corriger les résultats en conséquence. Si l'interférence dépasse 30 %, les données sont invalides et, à ces concentrations, sont rejetées. Si une interférence significative d'une substance d'essai avec un système de mesure des hormones se produit à plusieurs concentrations non cytotoxiques, il faut utiliser un système de mesure des hormones différent. Pour éviter l'interférence de substances contaminantes, il est recommandé d'extraire les hormones du milieu au moyen d'un solvant approprié; on trouvera des méthodes possibles dans le rapport de validation (4).

Tableau 1

Critères de performance pour les systèmes de mesure des hormones

Paramètre	Critère
Sensibilité de la méthode de mesure	Limite de quantification (LdQ) T: 100 pg/ml; E2: 100pg/ml ^(a)
Rendement d'extraction des hormones (seulement quand l'extraction est nécessaire)	Les taux de récupération moyens (sur la base de mesures en triple) pour les quantités d'hormone ajoutées ne montrent pas un écart supérieur à 30 % par rapport à la quantité ajoutée.
Interférence avec les produits chimiques (seulement systèmes à base d'anticorps)	Il convient qu'il n'y ait pas de réactivité croisée importante ($\geq 30\%$ de la production basale d'hormone pour l'hormone considérée) avec aucune des hormones produites par les cellules ^(b) ^(c)

^(a) Note: Les limites de la méthode de mesure reposent sur les valeurs de la production de base d'hormones présentées dans le tableau 5, et elles ont pour base les performances. Si une plus grande production basale d'hormones peut être atteinte, la limite peut être plus élevée.

^(b) Certains anticorps de la T et de l'E2 peuvent produire une réaction croisée respectivement avec l'androstènedione et l'œstrone, à un pourcentage plus élevé. Dans ce cas, il n'est pas possible de déterminer exactement les effets sur la 17 β -HSD. Toutefois, les données peuvent néanmoins fournir des informations utiles concernant les effets sur la production d'œstrogènes ou d'androgènes en général. Dans ce cas, les données sont exprimées en réponses androgènes/œstrogènes au lieu d'E2 et T.

^(c) C'est-à-dire: cholestérol, prégnénolone, progestérone, 11-désoxycorticostérone, corticostérone, aldostérone, 17 α -prégnénolone, 17 α -progestérone, désoxycortisol, cortisol, DHEA, androstènedione, œstrone.

Test d'aptitude du laboratoire

33. Avant de tester des substances chimiques inconnues, un laboratoire démontre, en effectuant le test d'aptitude, qu'il est capable d'établir et de maintenir les conditions de culture des cellules et les conditions d'expérience appropriées, requises pour conduire convenablement l'essai. Comme la réussite d'un essai est directement liée au personnel de laboratoire qui le conduit, ces procédures sont en partie répétées en cas de changement de personnel.
34. Ce test d'aptitude sera conduit dans les mêmes conditions que celles énoncées dans les paragraphes 38 à 40 en exposant les cellules à 7 concentrations croissantes d'inducteurs et d'inhibiteurs forts, modérés et faibles ainsi qu'à une substance chimique négative (voir le tableau 2). Précisément, comme l'indique le tableau 2, les produits chimiques à tester sont: la forskoline (n° CAS 66575-29-9), inducteur fort; le prochloraz (n° CAS 67747-09-5), inhibiteur fort; l'atrazine (n° CAS 1912-24-9), inducteur modéré; l'aminogluthéthimide (n° CAS 125-84-8), inhibiteur modéré; le bisphénol A

▼ **M5**

(n° CAS 80-05-7), inducteur faible (production d'E2) et inhibiteur faible (production de T); la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) (n° CAS 9002-61-3), substance négative. Des plaques distinctes sont testées pour tous les produits chimiques suivant le format présenté dans le tableau 6. Une plaque de CQ (tableau 4, paragraphes 36 et 37) est incluse à chaque exécution quotidienne pour les produits chimiques du test d'aptitude

Tableau 2

Substances chimiques du test d'aptitude et concentrations d'exposition

Substance chimique	Concentrations d'essai [μM]
Prochloraz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskoline	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazine	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutéthimide	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisphénol A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

(^a) Témoin solvant (DMSO) (0), 1 μl DMSO/puits

L'exposition des H295R aux produits chimiques s'effectue dans des plaques à 24 puits durant le test d'aptitude du laboratoire. Le dosage est en μM pour toutes les doses des produits chimiques d'essai. Les doses sont administrées dans le DMSO à 0,1 % (v/v) par puits. Toutes les concentrations d'essai sont testées dans des puits en triple (tableau 6). On utilise des plaques distinctes pour chaque substance chimique. Une plaque de CQ est incluse à chaque exécution quotidienne.

35. Les analyses de viabilité des cellules et d'hormones sont conduites comme indiqué dans les paragraphes 42 à 46. La valeur seuil (concentration minimale avec effet observé, CME0) et la décision de classification sont enregistrées et comparées aux valeurs du tableau 3. Les données sont considérées comme acceptables si elles satisfont aux conditions du tableau 3 pour la CME0 et la décision de classification.

Tableau 3

Valeurs seuils (CME0) et décisions de classification pour les substances du test d'aptitude

	n° CAS	CME0 [μM]		Décision de classification	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (Inhibition)	+ (Inhibition)
Forskoline	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (Induction)	+ (Induction)
Atrazine	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induction)	+ (Induction)
Aminoglutéthimide	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibition)	+ (Inhibition)

▼ M5

	n° CAS	CME0 [μ M]		Décision de classification	
		T	E2	T	E2
Bisphénol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibition)	+ (Induction)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Négatif	Négatif

(^a) +, positif

n/a: non applicable étant donné qu'aucun changement ne doit avoir lieu après l'exposition aux concentrations non cytotoxiques du témoin négatif.

Plaque de contrôle de qualité

36. La plaque de contrôle de qualité (CQ) est utilisée pour vérifier la performance des cellules H295R dans des conditions de culture standard et pour établir une base de données historique pour les concentrations d'hormone dans les témoins solvant et les témoins positifs et négatifs, ainsi que d'autres mesures de CQ au cours du temps.

— Il faut évaluer la performance des cellules H295R au moyen d'une plaque de CQ pour chaque lot ATCC nouveau ou après utilisation, pour la première fois, d'un stock de cellules précédemment congelées sauf si le test d'aptitude du laboratoire (paragraphe 32-34) a été effectué avec ce lot de cellules.

— Une plaque de CQ fournit une évaluation complète des conditions de l'essai (par exemple viabilité des cellules, témoins solvant, témoins négatifs et positifs, ainsi que la variabilité intra- et interessai) quand on teste les produits chimiques et elle fait partie de chaque exécution de l'essai.

37. Le test de CQ s'effectue dans une plaque à 24 puits et suit les mêmes procédures d'incubation, de dosage, de viabilité des cellules/cytotoxicité, d'extraction des hormones et d'analyse des hormones décrites dans les paragraphes 38 à 46 pour l'essai des produits chimiques. La plaque de CQ contient des blancs, des témoins solvant et deux concentrations d'un inducteur connu (forskoline, 1; 10 μ M) et d'un inhibiteur connu (prochloraz, 0,1; 1 μ M) de la synthèse de l'E2 et de la T. En outre, on utilise du MeOH dans certains puits comme témoin positif pour l'essai de viabilité/cytotoxicité. Le tableau 4 présente une description détaillée de la disposition de la plaque. Les critères à satisfaire sur la plaque de CQ sont énoncés dans le tableau 5. Il convient que la production de base d'hormone minimale pour la T et l'E2 soit atteinte dans les témoins solvant et dans les blancs.

Tableau 4

Disposition de la plaque de contrôle de qualité pour tester la performance des cellules H295R non exposées et des cellules exposées à un inhibiteur connu (PRO = prochloraz) et à un inducteur connu (FOR = forskoline) de la production d'E2 et de T. Quand l'expérience d'exposition est terminée et après avoir enlevé le milieu, on ajoute une solution de méthanol à 70 % à tous les puits MeOH pour servir de témoin positif pour la cytotoxicité [voir l'essai de cytotoxicité dans l'appendice III du rapport de validation (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	Blanc (^a)	Blanc (^a)	Blanc (^a)	Blanc (^a) (+ MeOH) (^b)	Blanc (^a) (+ MeOH) (^b)	Blanc (^a) (+ MeOH) (^b)
B	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)

▼ M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

(a) Les cellules dans les puits blancs ne reçoivent que du milieu (pas de solvant).

(b) Le méthanol (MeOH) est ajouté après que l'exposition est terminée et que le milieu a été retiré de ces puits.

(c) Témoin solvant DMSO (1 μl/puits).

Tableau 5

Critères de performance pour la plaque de contrôle de qualité

	T	E2
Production de base d'hormone dans le témoin solvant (TS)	≥ 5 fois la LdQ	≥ 2,5 fois la LdQ
Induction (10 μM forskoline)	≥ 1,5 fois le TS	≥ 7,5 fois le TS
Inhibition (1 μM prochloraze)	≤ 0,5 fois le TS	≤ 0,5 fois le TS

PROCÉDURE D'EXPOSITION AUX SUBSTANCES CHIMIQUES

38. On retire les cellules préincubées de l'incubateur (paragraphe 21) et on les vérifie au microscope pour s'assurer qu'elles sont en bon état (attachement, morphologie) avant le dosage.
39. On place les cellules dans une enceinte de biosécurité, on enlève le milieu supplémenté et on le remplace par un nouveau milieu supplémenté (1 ml/puits). Le DMSO est le solvant préconisé pour la présente méthode d'essai. Au cas où il y aurait des raisons d'utiliser d'autres solvants, il faut en présenter la justification scientifique. On expose les cellules à la substance d'essai en ajoutant 1 μl de la solution mère appropriée dans le DMSO [voir l'appendice II du rapport de validation (4)] pour 1 ml de milieu supplémenté (volume du puits). Il en résulte une concentration finale de 0,1 % de DMSO dans les puits. Pour garantir un mélange adéquat, on préfère généralement que la solution mère appropriée de la substance d'essai dans le DMSO soit mélangée avec le milieu supplémenté pour obtenir la concentration finale souhaitée pour chaque dose, et que le mélange soit ajouté dans chaque puits immédiatement après avoir enlevé l'ancien milieu. Si l'on choisit cette option, il convient que la concentration de DMSO (0,1 %) reste la même pour tous les puits. Les puits contenant les deux plus fortes concentrations sont examinés visuellement pour détecter la formation de précipités ou d'une opacité indiquant une solubilité incomplète de la substance d'essai, au moyen d'un microscope stéréoscopique. Si l'on observe ce phénomène (opacité, formation de précipités), on examine aussi les puits contenant la concentration immédiatement inférieure (et ainsi de suite) et il faut exclure de la suite de l'évaluation et de l'analyse les concentrations non complètement dissoutes. On remet la plaque dans l'incubateur à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 48 heures. Le tableau 6 montre la disposition de la plaque pour les substances d'essai. Les désignations «stock 1» à «stock 7» montrent l'emplacement des doses croissantes de la substance d'essai.

▼M5

Tableau 6

Disposition des doses pour l'exposition des cellules H295R aux substances d'essai dans une plaque à 24 puits

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stock 4	Stock 4	Stock 4
B	Stock 1	Stock 1	Stock 1	Stock 5	Stock 5	Stock 5
C	Stock 2	Stock 2	Stock 2	Stock 6	Stock 6	Stock 6
D	Stock 3	Stock 3	Stock 3	Stock 7	Stock 7	Stock 7

40. Après 48 heures on retire les plaques d'exposition de l'incubateur et on examine tous les puits au microscope pour observer l'état des cellules (attachement, morphologie, degré de confluence) et les signes de cytotoxicité. On divise le milieu de chaque puits en deux parties égales (environ 490 µl chacune) et on les transfère dans deux fioles distinctes convenablement étiquetées (c'est-à-dire qu'une aliquote fournit un échantillon de réserve pour chaque puits). Pour éviter que les cellules ne sèchent, on retire le milieu, un rang ou une colonne à la fois, et on le remplace par le milieu de l'essai de viabilité des cellules/cytotoxicité. Si l'on ne mesure pas immédiatement la viabilité des cellules/cytotoxicité, on ajoute à chaque puits 200 µl de PBS avec Ca²⁺ et Mg²⁺. On congèle les milieux à - 80 °C jusqu'aux opérations ultérieures d'analyse des concentrations d'hormone (voir les paragraphes 44-46). La T et l'E2 dans un milieu gardé à - 80 °C sont généralement stables pendant au moins 3 mois, mais il convient que la stabilité des hormones durant le stockage soit documentée dans chaque laboratoire.
41. Immédiatement après avoir enlevé le milieu, on détermine la viabilité des cellules/cytotoxicité pour chaque plaque d'exposition.

Détermination de la viabilité des cellules

42. On peut utiliser un essai de viabilité des cellules/cytotoxicité de son choix pour déterminer l'impact potentiel de la substance d'essai sur la viabilité des cellules. Cet essai doit être capable de fournir une mesure exacte du pourcentage de cellules viables présentes dans un puits, ou il convient de démontrer qu'il est directement comparable à/au (une fonction linéaire du) Live/Dead® Assay [voir l'appendice III du rapport de validation (4)]. Le test MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium] est un autre essai dont on a montré qu'il fonctionne bien également (18). L'évaluation de la viabilité des cellules au moyen des méthodes précitées est une mesure relative qui ne présente pas nécessairement une relation linéaire avec le nombre absolu de cellules dans un puits. En conséquence, l'analyste effectue parallèlement une évaluation visuelle subjective de chaque puits, et des photos numériques des TS et des deux concentrations non cytotoxiques les plus élevées sont prises et archivées de manière à permettre, si nécessaire, une évaluation ultérieure de la densité exacte des cellules. S'il ressort de l'inspection visuelle ou de l'essai de viabilité/cytotoxicité qu'il semble y avoir une augmentation du nombre de cellules, il faut vérifier l'augmentation observée. Si l'augmentation est confirmée, ce point est consigné dans le rapport d'essai. La viabilité des cellules s'exprime par rapport à la réponse moyenne dans les TS, considérée correspondre à 100 % de cellules viables, et est calculée comme il convient selon l'essai de viabilité/toxicité cellulaire utilisé. Pour le test MTT, la formule suivante peut être utilisée:

▼ **M5**

% de cellules viables = (réponse dans le puits – réponse moyenne dans les puits traités au MeOH [= 100 % de cellules mortes]) ÷ (réponse moyenne dans les puits TS – réponse moyenne dans les puits traités au MeOH [= 100 % de cellules mortes])

43. Les puits ayant une viabilité inférieure à 80 %, par rapport à la viabilité moyenne dans les TS (= 100 % de viabilité), ne sont pas inclus dans l'analyse finale des données. L'inhibition de la stéroïdogenèse qui a lieu en présence de presque 20 % de cytotoxicité nécessite un examen attentif pour s'assurer que la cytotoxicité n'en est pas la cause.

Analyse des hormones

44. Chaque laboratoire peut utiliser un système de mesure des hormones de son choix pour l'analyse de la T et de l'E2. On peut utiliser les aliquotes de réserve du milieu provenant de chaque groupe de traitement pour préparer des dilutions amenant la concentration dans la partie linéaire de la courbe standard. Comme indiqué au paragraphe 29, chaque laboratoire démontre la conformité de son système de mesure des hormones (par exemple ELISA, RIA, CPL-SM, CPL-SM/SM) aux critères de CQ en analysant le milieu supplémenté dopé par un étalon d'hormone interne avant d'effectuer des essais de CQ ou de tester des produits chimiques. Pour s'assurer que les composants du système de test n'interfèrent pas avec la mesure des hormones, il peut être nécessaire d'extraire les hormones des milieux avant de les mesurer (voir le paragraphe 30 pour les conditions dans lesquelles une extraction est ou non requise). Il est recommandé d'effectuer l'extraction suivant les procédures de l'appendice III du rapport de validation (4).
45. Si l'on utilise une trousse de test commerciale pour mesurer la production d'hormones, l'analyse des hormones est conduite comme spécifié dans les manuels fournis par le fabricant. La plupart des fabricants ont leur propre procédure de conduite des analyses d'hormones. Il faut ajuster les dilutions des échantillons de telle sorte que les concentrations d'hormone attendues pour les témoins solvant se situent au centre de la partie linéaire de la courbe standard de l'essai considéré [appendice III du rapport de validation (4)]. Les valeurs en dehors de la partie linéaire de la courbe standard sont rejetées.
46. Les concentrations finales d'hormone se calculent comme suit:

Exemple:

Extrait:	450 µl de milieu
Reconstitué dans:	250 µl de tampon de l'essai
Dilution dans l'essai:	1:10 (pour amener l'échantillon dans la partie linéaire de la courbe standard)
Concentration d'hormone dans l'essai:	150 pg/ml (déjà ramené à la concentration par ml d'échantillon testé)
Récupération:	89 %
Concentration finale d'hormone =	(concentration d'hormone [par ml] ÷ récupération) (facteur de dilution)
Concentration finale d'hormone =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼ **M5****Choix des concentrations de test**

47. On procède à au moins deux exécutions indépendantes de l'essai. À moins que des informations antérieures, par exemple sur les limites de solubilité ou la cytotoxicité, fournissent une base pour le choix des concentrations d'essai, il est recommandé d'espacer les concentrations d'essai pour l'exécution initiale par des intervalles \log_{10} , avec une concentration maximale de 10^{-3} M. Si la substance chimique est soluble et non cytotoxique aux concentrations d'essai, et que la première exécution a été négative pour toutes les concentrations, cela est confirmé par une nouvelle exécution dans les mêmes conditions que la première (tableau 7). Si les résultats de la première exécution sont équivoques (c'est-à-dire si le facteur multiplicatif de changement par rapport au TS n'est statistiquement significatif que pour une seule concentration) ou positifs (c'est-à-dire si le facteur multiplicatif est statistiquement significatif pour au moins deux concentrations adjacentes), le test est répété comme l'indique le tableau 7, en affinant les concentrations d'essai choisies. Les concentrations d'essai dans les exécutions 2 et 3 (le cas échéant) sont ajustées sur la base des résultats de l'exécution initiale en affinant les concentrations qui ont généré un effet par un espacement 1/2-log (par exemple si l'exécution initiale avec 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1 000 μM a eu pour résultat une induction à 1 et 10 μM , les concentrations à tester à la deuxième exécution sont 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μM), à moins qu'il ne faille employer des concentrations plus faibles pour trouver une CMEO. Dans ce dernier cas, il faut utiliser à la deuxième exécution au moins cinq concentrations au-dessous de la concentration la plus faible testée à la première exécution, avec une échelle 1/2-log. Si la deuxième exécution ne confirme pas la première (c'est-à-dire qu'on n'observe pas de significativité statistique à la concentration précédemment testée positive ± 1 incrément de concentration), il faut exécuter une troisième expérience en revenant aux conditions initiales. Des résultats équivoques à la première exécution sont considérés comme négatifs si l'effet observé ne peut être confirmé dans aucune des deux exécutions suivantes. Les résultats équivoques sont considérés comme des réponses positives (effet) si la réponse peut être confirmée dans au moins une exécution supplémentaire à ± 1 incrément de concentration près (voir le paragraphe 55 pour la procédure d'interprétation des données).

Tableau 7

Matrice de décision pour les scénarios de résultats possibles

Exécution 1	Exécution 2		Exécution 3		Décision	
	Scénario	Décision	Scénario	Décision	Scénario	Décision
Négatif	Confirmer ^(a)	Négatif	Fin			X
Négatif	Confirmer ^(a)	Positif	Affiner ^(b)	Négatif		X
Équivoque ^(c)	Affiner ^(b)	Négatif	Confirmer ^(a)	Négatif		X
Équivoque ^(c)	Affiner ^(b)	Négatif	Confirmer ^(a)	Positif	X	
Équivoque ^(c)	Affiner ^(b)	Positif			X	
Positif	Affiner ^(b)	Négatif	Confirmer ^(a)	Positif	X	

▼ M5

Exécution 1	Exécution 2		Exécution 3		Décision	
Scénario	Décision	Scénario	Décision	Scénario	Positive	Négative
Négatif	Confirmer ^(a)	Positif	Affiner ^(b)	Positif	X	
Positif	Affiner ^(b)	Positif	Fin		X	

^(a) Confirmer l'exécution précédente avec le même plan d'expérience.

^(b) Réexécuter l'essai avec un espacement 1/2-log des concentrations (en encadrant la concentration pour laquelle on a observé un effet significatif dans l'expérience précédente).

^(c) Le facteur multiplicatif montre une différence statistiquement significative par rapport au TS pour une seule concentration.

Contrôle de qualité de la plaque de test

48. En plus des critères afférents à la plaque de CQ, il convient de satisfaire d'autres critères de qualité présentés dans le tableau 8 concernant les variations acceptables entre les puits répliqués, les expériences répliquées, la linéarité et la sensibilité des systèmes de mesure des hormones, la variabilité des mesures d'hormone répliquées d'un même échantillon, et le pourcentage de récupération des dopages d'hormone après extraction du milieu (le cas échéant; voir le paragraphe 30 concernant les conditions dans lesquelles une extraction est requise). Pour être prises en compte dans la suite de l'évaluation, il convient que les données se situent à l'intérieur des intervalles acceptables définis pour chaque paramètre. Si ce n'est pas le cas, il convient de noter dans la feuille de travail que les critères de CQ n'ont pas été remplis pour l'échantillon en question, et de réanalyser cet échantillon ou de le retirer de l'ensemble de données.

Tableau 8

Intervalles et/ou variation (%) acceptables pour les paramètres des plaques de test de l'essai H295R

(LdQ: limite de quantification du système de mesure des hormones. CV: coefficient de variation; TS: témoin solvant; DPM: désintégrations par minute)

	Comparaison	T	E2
Production de base d'hormone dans les TS	Facteur multiplicatif par rapport à la LdQ	≥ 5 fois	≥ 2,5 fois
Expériences d'exposition - CV intra-plaque pour les TS (puits répliqués)	Concentrations absolues	≤ 30 %	≤ 30 %
Expériences d'exposition CV intra-plaques pour les TS (expériences répliquées)	Facteur multiplicatif	≤ 30 %	≤ 30 %
Système de mesure des hormones - sensibilité	Facteur de diminution détectable par rapport aux TS	≥ 5 fois	≥ 2,5 fois
Système de mesure des hormones - CV des mesures répliquées pour les TS ^(a)	Concentrations absolues	≤ 25 %	≤ 25 %
Extraction du milieu - Récupération de l'étalon ³ H interne (le cas échéant)	DPM	≥ 65 % du nominal	

^(a) Mesures répliquées d'un même échantillon

▼ **M5**

ANALYSE DES DONNÉES ET COMPTE RENDU

Analyse des données

49. Pour évaluer l'augmentation ou la diminution relative de la production d'hormones chimiquement altérée, il faut normaliser les résultats sur la base de la valeur de TS moyenne de chaque plaque de test et exprimer les résultats sous la forme du changement par rapport aux TS de chaque plaque. Toutes les données sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± 1 écart type.
50. Les données relatives aux hormones ne sont incluses dans l'analyse des données que pour les puits où la cytotoxicité était inférieure à 20 %. Les changements relatifs sont calculés comme suit:

Changement relatif = (concentration d'hormone dans le puits) \div (concentration d'hormone moyenne des puits à témoin solvant).

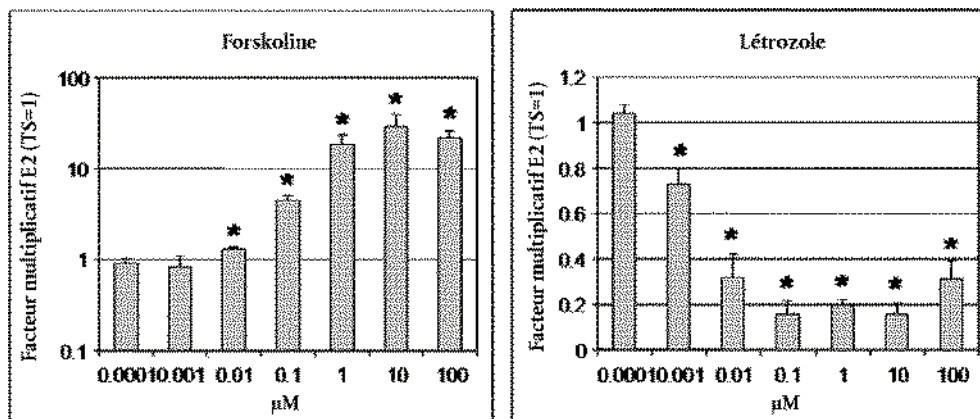
51. S'il ressort de l'inspection visuelle du puits ou de l'essai de viabilité/cytotoxicité décrit dans le paragraphe 42 qu'il semble y avoir une augmentation du nombre de cellules, il faut vérifier l'augmentation observée. Si l'augmentation est confirmée, ce point est consigné dans le rapport d'essai.
52. Avant de conduire des analyses statistiques, il faut évaluer les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances. La normalité est évaluée au moyen de graphiques de probabilités standard ou autre méthode statistique appropriée (par exemple test de Shapiro-Wilk). Si les données (changements relatifs) ne sont pas distribuées suivant une loi normale, il faut essayer de les transformer de manière à approcher une distribution normale. Si les données suivent ou approchent une distribution normale, il faut analyser les différences entre les groupes de concentration de la substance chimique et les TS au moyen d'un test paramétrique (par exemple test de Dunnett), la concentration étant la variable indépendante et la réponse (changement relatif), la variable dépendante. Si les données ne suivent pas une distribution normale, il faut utiliser un test non paramétrique approprié (par exemple test de Kruskal-Wallis, test de rangs multiunivoque de Steel). Les différences sont considérées comme significatives à $p \leq 0,05$. Les évaluations statistiques se font sur la base des valeurs moyennes des puits représentant des points de données répliqués indépendants. Il est à prévoir que, en raison du large espacement des doses dans la première exécution (échelle log₁₀), il ne sera pas possible, dans de nombreux cas, de décrire une relation claire concentration-réponse où les deux doses les plus élevées soient dans la partie linéaire de la courbe en S. En conséquence, pour la première exécution ou tout autre ensemble de données dans ce cas (par exemple quand on ne peut estimer une efficacité maximale) on appliquera des statistiques à variable fixe de type I, comme décrit ci-dessus.
53. Si au moins deux points de données se situent dans la partie linéaire de la courbe et si l'on peut calculer les efficacités maximales — comme on le prévoit pour certaines des deuxièmes exécutions effectuées avec un espacement 1/2-log des concentrations d'exposition — un modèle probit, logit ou autre modèle de régression approprié est utilisé pour calculer les concentrations efficaces (par exemple CE50 et CE20).
54. Les résultats sont fournis à la fois sous forme graphique (diagramme à barres représentant la moyenne ± 1 écart type) et tabulaire (CME0/CSEO, direction de l'effèt et ampleur maximale de la réponse dans la partie dose-réponse des données (voir l'exemple de la figure 3). L'appréciation des données n'est considérée comme valable que si elle repose sur au moins deux expériences exécutées indépendamment. Une expérience est considérée comme indépendante si elle a été exécutée à une date différente avec un nouvel ensemble de solutions et de témoins. L'intervalle des concentrations utilisé dans les exécutions 2 et 3 (si nécessaire) peut être adapté à l'appui des résultats de l'exécution 1, afin de mieux définir l'intervalle dose-réponse contenant la CME0 (voir le paragraphe 47).

▼ M5

Figure 3

Exemple de la présentation et de l'évaluation des données obtenues durant la conduite de l'essai H295R, sous forme graphique et tabulaire

[Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin solvant ($p < 0,05$). CME0: concentration minimale avec effet observé; changement maximal: ampleur maximale de la réponse observée à une concentration quelconque par rapport à la réponse moyenne des TS (= 1)]



Substance chimique	CME0	Changement maximal
Forskoline	0,01	0,15 fois
Létrozole	0,001	29 fois

Procédure d'interprétation des données

55. Une substance d'essai est jugée positive si le rapport multiplicatif d'induction est statistiquement significatif ($p \leq 0,05$) par rapport au témoin solvant à deux concentrations adjacentes dans au moins deux exécutions de l'essai indépendantes (tableau 7). Une substance d'essai est jugée négative après deux exécutions négatives indépendantes ou après trois exécutions, dont deux négatives et une équivoque ou positive. Si les données générées dans trois expériences indépendantes ne correspondent à aucun critère de décision énoncé dans le tableau 7, les résultats expérimentaux ne sont pas interprétables. Les résultats à des concentrations qui dépassent les limites de solubilité ou à des concentrations cytotoxiques ne doivent pas être inclus dans l'interprétation des résultats.

Rapport d'essai

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

Établissement réalisant l'essai

— Nom et adresse de l'établissement

— Directeur de l'étude et autres membres du personnel et leur responsabilité dans l'étude

— Dates de début et de fin de l'étude

▼ M5*Substance d'essai, réactifs et témoins*

- Identité (nom/n^o CAS, le cas échéant), source, numéro de lot, pureté, fournisseur et caractérisation de la substance d'essai, des réactifs et des témoins
- Nature physique et propriétés physicochimiques pertinentes de la substance d'essai
- Conditions de stockage et méthode et fréquence de la préparation de la substance d'essai, des réactifs et des témoins
- Stabilité de la substance d'essai

Cellules

- Source et type des cellules
- Nombre de passages des cellules (identifiant de passage de cellules) des cellules utilisées dans l'essai
- Description des procédures d'entretien des cultures de cellules

Exigences préalables à l'essai (le cas échéant)

- Description et résultats du test d'interférence de la substance chimique avec la mesure des hormones
- Description et résultats des mesures de rendement d'extraction des hormones
- Courbes standard et d'étalonnage pour tous les essais d'analyse à conduire
- Limites de détection pour les essais d'analyse choisis

Conditions de l'essai

- Composition des milieux
- Concentration de la substance d'essai
- Densité des cellules (concentration des cellules estimée ou mesurée à 24 heures et 48 heures)
- Solubilité de la substance d'essai (limite de solubilité, si elle a été déterminée)
- Temps et conditions d'incubation

Résultats de l'essai

- Données brutes pour chaque puits pour les témoins et les substances d'essai — chaque mesure répliquée sous la forme des données originales fournies par l'instrument utilisé pour mesurer la production d'hormone (par exemple densité optique, unités de fluorescence, DPM, etc.)
- Validation de la normalité ou exposé de la transformation des données
- Réponses moyennes ± 1 écart type pour les puits mesurés
- Données de cytotoxicité (concentrations d'essai ayant provoqué la cytotoxicité)
- Confirmation de la conformité aux exigences de CQ

▼ **M5**

- Changement relatif par rapport au témoin solvant, corrigé de la cytotoxicité
- Diagramme à barres montrant le changement relatif (facteur multiplicatif) à chaque concentration, l'écart type et la signification statistique comme décrit dans les paragraphes 49-54

Interprétation des données

- Application de la procédure d'interprétation des données aux résultats et discussion des constatations

Discussion

- Ressort-il de l'étude des indications quelconques concernant la possibilité que les données T/E2 puissent subir l'influence d'effets indirects sur la voie des glucocorticoïdes ou des minéralocorticoïdes?

*Conclusions***BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (2002), «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens», à l'appendice 2 du chapitre B.54 de la présente annexe.
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R., et Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., et Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies, *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23-30.
- (4) OCDE (2010), Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production, série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 132, ENV/JM/MONO(2010)31, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- (5) OCDE (2010), Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis, série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 133, ENV/JM/MONO(2010)32, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, disponible à l'adresse suivante: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S., et Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G., et Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M., et Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118:265-272.

▼ **M5**

- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P., et Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A., et La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W., et Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S., et Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P., et Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R., et Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Chapitre B.55 de la présente annexe: «Bioessai de Hershberger sur le rat: essai de dépistage à court terme de propriétés (anti) androgéniques», ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, n° 441, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/env/test-guidelines>
- (17) Shapiro, R., et Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- (19) Brock, B.J., et Waterman, M.R. (1999), Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*, 38:1598-1606.
- (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J., et Goldfarb, P.S. (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.

▼ **M5***Appendice*

DÉFINITIONS

CMEO: concentration minimale avec effet observé; la plus faible concentration à laquelle la réponse de l'essai est statistiquement différente de celle du témoin solvant.

Confluence: couverture ou prolifération permise aux cellules sur ou dans le milieu de culture ou à l'intérieur.

Contrôle de qualité (CQ): les mesures nécessaires pour s'assurer de la validité des données.

CSEO: concentration sans effet observé; la plus forte concentration testée si l'essai ne donne pas de réponse positive.

CV: coefficient de variation; rapport de l'écart type d'une distribution à sa moyenne arithmétique.

CYP: mono-oxygénases du cytochrome P450; famille de gènes et les d'enzymes issues de ces gènes, qui participent à la catalyse de réactions biochimiques variées, et notamment à la synthèse et au métabolisme des hormones stéroïdes.

DPM: désintégrations par minute; nombre d'atomes dans une quantité donnée de matière radioactive dont la désintégration est détectée par minute.

E2: 17 β -estradiol, œstrogène le plus important dans les systèmes mammifères.

Exécution indépendante: expérience indépendante caractérisée par un nouvel ensemble de solutions et de témoins.

H295R: cellules de carcinome surrénalien humain, qui ont les caractéristiques physiologiques de cellules surrénaliennes fœtales humaines zonalement indifférenciées et qui expriment toutes les enzymes de la voie de la stéroïdogenèse. On peut les obtenir de l'ATCC.

LdQ: limite de quantification; la plus faible quantité d'une substance chimique qu'on peut distinguer de l'absence de cette substance (valeur de blanc) dans une limite de confiance donnée. Pour les besoins de la présente méthode d'essai, la LdQ est généralement définie par le fabricant des systèmes d'essai, sauf autre spécification.

Milieu de congélation: utilisé pour congeler et stocker les cellules; il est constitué de milieu-mère stock auquel sont ajoutés du BD Nu-Serum et du diméthylsulfoxyde.

Milieu supplémenté: milieu-mère stock plus BD Nu-Serum et ITS+ Premix, voir l'appendice II du rapport de validation (4).

Milieu-mère: base de la préparation d'autres réactifs. Il est constitué d'un mélange 1:1 de DMEM (milieu d'Eagle modifié par Dulbecco) et de mélange nutritif F-12 de Ham (DMEM/F12) dans du tampon HEPES 15 mM sans rouge de phénol ni bicarbonate de soude. Le bicarbonate de soude est ajouté comme tampon, voir l'appendice II du rapport de validation (4).

Partie linéaire: partie de la courbe standard d'un système de mesure d'hormone où les résultats sont proportionnels à la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon.

Passage (repiquage): nombre de fois où les cellules sont séparées à partir de la mise en culture de cellules d'un stock congelé. Le passage initial à partir du stock congelé est numéroté «passage 1». Les cellules séparées 1 fois sont numérotées «passage 2», etc.

PBS: solution saline tampon phosphate de Dulbecco.

▼ M5

Plaque de contrôle de qualité: plaque à 24 puits contenant deux concentrations des témoins positifs et négatifs pour contrôler la performance d'un lot de cellules nouveau ou fournir les témoins positifs pour l'essai quand on teste les substances chimiques.

Plaque de test: plaque sur laquelle les cellules H295R sont exposées aux substances d'essai. Les plaques de test contiennent le témoin solvant et la substance d'essai à 7 niveaux de concentration en triple.

Stéroïdogénèse: voie de synthèse conduisant du cholestérol aux diverses hormones stéroïdes. Plusieurs intermédiaires de la voie de synthèse des stéroïdes comme la progestérone et la testostérone sont des hormones importantes en elles-mêmes, mais elles servent aussi de précurseurs à des hormones en aval.

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

T: testostérone; un des deux androgènes les plus importants dans les systèmes mammifères.

Trypsine 1X: solution diluée de l'enzyme trypsine, protéase à sérine pancréatique, utilisée pour décoller les cellules d'une plaque de culture, voir l'appendice III du rapport de validation (4).

▼ M5**B.58 ESSAIS DE MUTATIONS GÉNÉTIQUES DES CELLULES SOMATIQUES ET GERMINALES DE RONGEURS TRANSGÉNIQUES**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 488 de l'OCDE (2013). Les méthodes d'essai de l'Union européenne s'appliquent à toute une série d'essais de mutations in vitro permettant de détecter les mutations chromosomiques et/ou géniques. Certaines méthodes d'essai permettent de détecter des effets in vivo (à savoir les aberrations chromosomiques et la synthèse d'ADN non programmée) mais elles ne mesurent pas les mutations génétiques. Les essais de mutations chez les rongeurs transgéniques (RTG) répondent à ce besoin d'essais in vivo de mutations génétiques à la fois pratiques et exploitables à grande échelle.
2. Les essais de mutations chez les RTG ont fait l'objet d'un examen complet (24) (33). Pour ces essais, on utilise des rats et des souris transgéniques qui comportent de multiples copies de vecteurs navettes de plasmides ou de phages intégrés dans leurs chromosomes. Les transgènes contiennent des gènes rapporteurs pour la détection de différents types de mutations induites in vivo par les substances d'essai.
3. On compte les mutations qui se produisent chez un rongeur en retrouvant le transgène et en analysant le phénotype du gène rapporteur chez un hôte bactérien démuné du gène rapporteur. Les essais de mutations chez les RTG permettent de mesurer les mutations induites dans des gènes génétiquement neutres présents dans la quasi-totalité des tissus du rongeur. Ces essais permettent donc de surmonter un certain nombre d'obstacles qui entravent actuellement l'étude de la mutation génétique in vivo dans des gènes endogènes (quantité limitée de tissus appropriés pour l'analyse, sélection positive/négative par rapport aux mutations, par exemple).
4. Les données disponibles démontrent que les transgènes répondent aux mutagènes de manière similaire aux gènes endogènes, notamment en ce qui concerne la détection de substitutions d'une base par une autre, les décalages du cadre de lecture et les petites délétions et insertions (24).
5. Les ateliers internationaux sur les essais de génotoxicité (IWGT) ont approuvé la prise en compte des essais pour la détection in vivo des mutations génétiques chez les RTG et ont recommandé un protocole de mise en application de ces essais (15) (29). La présente méthode d'essai découle de ces recommandations. Le document référencé (16) donne une analyse plus détaillée des avantages induits par l'emploi de ce protocole.
6. On prévoit que, à l'avenir, il pourrait être possible de combiner des essais de mutations chez les RTG avec une étude de toxicité à doses répétées (chapitre B.7 de la présente annexe). Cependant, il est préalablement nécessaire d'obtenir des données afin de s'assurer que la sensibilité des essais de mutations chez les RTG n'est pas affectée par la réduction de la durée entre la fin de la période d'administration et le moment de l'échantillonnage. Cette durée est de 1 jour dans les essais de toxicité à doses répétées, alors qu'elle est de 3 jours dans les essais de mutations chez les RTG. Des données sont aussi requises pour s'assurer que la performance de l'étude de toxicité à doses répétées n'est pas affectée par l'utilisation d'une souche transgénique à la place de souches de rongeurs traditionnelles. Quand ces données seront disponibles, la présente méthode d'essai sera actualisée.
7. La définition des principaux termes figure dans l'appendice.

▼ **M5**

CONSIDÉRATIONS INITIALES

8. Les essais de mutations chez les RTG pour lesquels il existe un nombre de données suffisant pour permettre de donner un avis favorable à leur utilisation dans le cadre de la présente méthode d'essai sont les suivants: souris bactériophage lacZ (Muta™Mouse); souris plasmide lacZ; souris et rat gpt delta (gpt et Spi-); souris et rat lacI (Big Blue®), mis en œuvre dans des conditions normales. De plus, l'essai de sélection positive cII peut être utilisé pour évaluer les mutations dans les modèles Big Blue® et Muta™-Mouse. Dans les modèles de RTG, le paramètre utilisé pour évaluer la mutagenèse est normalement la fréquence des mutants; toutefois, une analyse moléculaire des mutations peut, si nécessaire, fournir des informations supplémentaires (voir paragraphe 24).
9. Ces essais de mutations génétiques in vivo chez les rongeurs sont particulièrement pertinents pour évaluer le risque mutagène dans la mesure où les réponses qu'ils apportent dépendent du métabolisme in vivo, de la pharmacocinétique, des processus de réparation de l'ADN et de la synthèse d'ADN de translésion, bien que ces paramètres varient selon les espèces, selon les tissus et selon les types de dommages subis par l'ADN. Un essai in vivo de mutations génétiques sert à analyser plus en détail un effet mutagène détecté par un système in vitro et à effectuer un suivi des résultats d'essais utilisant d'autres indicateurs in vivo (24). Outre le fait qu'elles soient mises en cause dans l'apparition de cancers, les mutations génétiques constituent un indicateur pertinent pour prédire les pathologies non cancéreuses des tissus somatiques dues à des facteurs mutagènes (12) (13) ainsi que les pathologies transmises par le biais des cellules germinales.
10. Si des éléments prouvent que la substance d'essai ou un métabolite pertinent n'atteindra aucun des tissus d'intérêt, il n'est pas opportun d'avoir recours à l'essai de mutations chez les RTG.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

11. Dans les essais décrits au paragraphe 8, le gène cible est d'origine bactérienne ou bactériophagique, et sa récupération à partir de l'ADN génomique du rongeur se fait par introduction du transgène dans un vecteur navette de bactériophages λ ou de plasmides. Cette procédure implique l'extraction de l'ADN génomique du tissu d'intérêt du rongeur, le traitement in vitro de l'ADN génomique (à savoir l'encapsidation des vecteurs λ ou la ligature et l'électroporation des plasmides pour retrouver le vecteur navette) et la détection ultérieure des mutations subies par les hôtes bactériens dans des conditions appropriées. Les essais emploient des transgènes neutres faciles à retrouver à partir de la plupart des tissus.
12. L'essai de base de mutations chez les RTG implique d'administrer une substance chimique au rongeur pendant un certain temps. Toute voie d'administration appropriée est autorisée, y compris l'implantation (essais de dispositifs médicaux, par exemple). La période totale de traitement d'un animal est appelée la période d'administration. L'administration est généralement suivie d'une période, antérieure au sacrifice, au cours de laquelle la substance d'essai n'est pas administrée et au cours de laquelle les lésions d'ADN non réparées se fixent sous forme de mutations stables. Dans la littérature, cette période est désignée sous diverses appellations telles que la période de manifestation, la période de fixation ou la période d'expression; la fin de cette période marque le moment de l'échantillonnage (15) (29). Après le sacrifice de l'animal, l'ADN génomique est isolé du (des) tissu(s) d'intérêt puis purifié.

▼ **M5**

13. Les données relatives à un seul tissu par animal, issues d'encapsidations/de ligatures multiples sont généralement agrégées, et la fréquence des mutants est généralement évaluée par le biais d'un nombre total d'unités formant plaque ou d'unités formant colonie compris entre 10^5 et 10^7 . En cas de recours à des méthodes de sélection positive, le nombre total d'unités formant plaque est déterminé à l'aide d'un ensemble séparé de plages non sélectives.
14. Les méthodes de sélection positive ont été développées pour qu'on puisse détecter plus facilement les mutations du gène *gpt* [souris et rat *gpt* delta, phénotype *gpt*⁻ (20) (22) (28)] et du gène *lacZ* [MutaTMMouse ou souris plasmide *lacZ* (3) (10) (11) (30)], tandis que les mutations du gène *lacI* chez les animaux Big Blue® sont détectées par le biais d'une méthode non sélective qui permet d'identifier les mutants en générant des plages de couleur (bleue). Les méthodes de sélection positive permettent également de détecter les mutations ponctuelles du gène *cII* du bactériophage λ utilisé comme vecteur navette [souris ou rat Big Blue®, MutaTMMouse (17)] et les délétions sur les gènes λ *red* et *gam* [sélection Spi⁻ chez souris et rat *gpt* delta) (21) (22) (28)]. On obtient la fréquence des mutants en divisant le nombre de plages/plasmides contenant les mutations qui se produisent dans le transgène par le nombre total de plages/plasmides retrouvés dans un même échantillon d'ADN. Dans les études de mutations chez les RTG, la fréquence des mutants est le paramètre observé. De plus, une fréquence de mutation peut être déterminée sous forme de fraction de cellules portant des mutations indépendantes; ce calcul nécessite de corriger l'expansion clonale par séquençage des mutants retrouvés (24).
15. Les mutations notées dans les essais de mutations ponctuelles *lacI*, *lacZ*, *cII* et *gpt* consistent essentiellement en substitutions d'une base par une autre, en décalages du cadre de lecture et en petites insertions/délétions. La part relative de ces types de mutations dans les mutations spontanées est similaire à celle observée pour le gène endogène *Hprt*. On observe des délétions importantes uniquement avec les essais de sélection du gène Spi⁻ et de plasmides du gène *lacZ* (24). Les mutations qui nous préoccupent sont les mutations *in vivo* chez la souris ou le rat. Les mutations *in vitro* et *ex vivo*, qui peuvent se produire lors de la récupération des phages/plasmides, de la réplication ou de la réparation sont relativement rares et peuvent, dans certains systèmes, être spécifiquement identifiées ou exclues par l'hôte bactérien ou le système de sélection positive.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations*Sélection de l'espèce animale*

16. On dispose actuellement de divers modèles de détection des mutations génétiques chez les souris transgéniques, et ces systèmes continuent d'être plus souvent utilisés que les modèles impliquant des rats transgéniques. Si le rat se révèle manifestement plus adapté que la souris pour l'étude (par exemple si l'on étudie le mécanisme de la cancérogenèse d'une tumeur constatée uniquement chez les rats, pour établir une corrélation avec une étude de toxicité chez les rats ou si l'on sait que le métabolisme des rats est plus représentatif du métabolisme humain), le recours à des modèles impliquant des rats transgéniques est envisagé.

Conditions d'encagement et d'alimentation

17. La température de la salle d'expérimentation animale est idéalement de 22 °C (\pm 3 °C). Si l'humidité relative est de 30 % au minimum et, de préférence, de 70 % au maximum, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'objectif est de maintenir une humidité relative de 50-60 %. La lumière est artificielle, avec une séquence quotidienne de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les aliments classiques pour animaux de laboratoire peuvent être utilisés et l'eau potable est fournie à satiété. Le choix des

▼ M5

aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation de la substance chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les animaux sont mis en cage par petits groupes (de cinq au maximum) du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

18. De jeunes adultes en bonne santé et sexuellement matures (âgés de 8-12 semaines au début du traitement) sont répartis au hasard dans les groupes témoins et les groupes de traitement. Les animaux sont identifiés individuellement. Les animaux sont gardés dans leurs cages pendant au moins 5 jours avant le commencement de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire. Les cages sont disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effets dus à l'emplacement des cages. Au début de l'étude, il convient que la variation pondérale des animaux soit minimale et ne dépasse pas $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

19. Les substances d'essai solides sont dissoutes, mises en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés ou incorporées dans les aliments ou dans l'eau de boisson avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou diluées avant d'être administrées. En cas d'exposition par inhalation, les substances d'essai peuvent être administrées sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Il faut utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Conditions expérimentales*Solvant/véhicule*

20. Il convient que le solvant/véhicule n'ait pas d'effets toxiques aux volumes de dose administrés et ne soit pas suspecté de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels fait l'objet de justification par des données de référence faisant état de leur compatibilité. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible.

Témoins positifs

21. Des animaux témoins positifs sont normalement inclus simultanément dans l'essai. Cependant, pour les laboratoires ayant fait preuve de leur compétence (voir paragraphe 23) et qui utilisent ces essais en routine, l'ADN d'animaux témoins positifs traités précédemment peut être pris en compte dans chaque étude pour confirmer la réussite de la méthode. Il convient que cet ADN issu d'expériences précédentes provienne de la même espèce et des mêmes tissus d'intérêt, et soit stocké dans de bonnes conditions (voir paragraphe 36). Quand des témoins positifs sont inclus simultanément dans l'essai, il n'est pas nécessaire de les administrer par la même voie que celle de la substance d'essai; toutefois, il convient d'avoir la certitude que les témoins positifs induisent des mutations dans un ou plusieurs tissus d'intérêt pour la substance d'essai. Les doses des substances testées utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets faibles ou modérés qui permettent d'évaluer de manière critique les performances et la sensibilité de l'essai. Des exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles figurent dans le tableau I.

▼ M5

Tableau 1

Exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles

Substance servant de témoin positif et no CAS	Dénomination Einescs et no Einescs	Caractéristiques	Tissu cible de la mutation	
			Rat	Souris
N-nitroso-N-éthylurée [no CAS 759-73-9]	N-éthyl-N-nitrosurée [212-072-2]	Mutagène à action directe	Foie, poumons	Moelle osseuse, côlon, épithélium du côlon, intestins, foie, poumons, rate, rein, cellules de granulosa entourant l'ovocyte, cellules germinales mâles
Carbamate d'éthyle (uréthane) [no CAS 51-79-6]	Uréthane [200-123-1]	Mutagène, nécessite d'être métabolisé mais ne produit que des effets faibles		Moelle osseuse, secteur gastrique antérieur, intestin grêle, foie, poumons, rate
Toluène-2,4-diamine [no CAS 95-80-7]	4-méthyl-m-phénylène-diamine [202-453-1]	Mutagène, nécessite d'être métabolisé, positif également dans l'essai Spi-	Foie	Foie
Benzo[a]pyrène [no CAS 50-32-8]	Benzo[def]chrysène [200-028-5]	Mutagène, nécessite d'être métabolisé	Foie, épiploon	Moelle osseuse, glandes mammaires, côlon, secteur gastrique antérieur, estomac glandulaire, cœur, foie, poumons, cellules germinales mâles

Témoins négatifs

22. Les témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et sinon traités de manière identique aux groupes témoins, sont inclus à chaque moment d'échantillonnage. En l'absence de données significatives observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas d'effets délétères ou mutagènes, des témoins non traités sont également inclus à chaque moment d'échantillonnage afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

Vérification des compétences du laboratoire

23. La compétence à mener ces essais est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire les résultats escomptés à partir des données publiées (24) concernant: 1) les fréquences de mutants avec les substances des contrôles positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1, les non mutagènes et les témoins contenant le véhicule et 2) la récupération des transgènes de l'ADN génomique (efficacité de l'encapsulation, par exemple).

Séquençage des mutants

24. Pour les applications réglementaires, le séquençage de l'ADN des mutants n'est pas obligatoire, notamment en cas de résultat nettement positif ou négatif. Néanmoins, les données de séquençage peuvent être utiles si l'on observe de grandes variations entre les individus. Dans ces cas-là, le séquençage peut servir à exclure l'hypothèse de jackpots ou de clonages en permettant d'identifier la proportion de mutants uniques dans un tissu

▼ M5

particulier. Le séquençage de 10 mutants environ par tissu et par animal suffit à déterminer si les mutants clonaux contribuent à la fréquence des mutants; séquençer jusqu'à 25 mutants peut se révéler nécessaire pour corriger mathématiquement les aspects de clonalité dans la fréquence des mutants. Le séquençage des mutants peut également être envisagé si l'on constate que la fréquence des mutants est en légère augmentation (la fréquence est alors légèrement supérieure aux valeurs des témoins non traités). Des différences en matière de spectre de mutants entre les colonies de mutants des animaux traités et des animaux non traités peuvent appuyer l'hypothèse d'un effet mutagène (29). De plus, les spectres de mutation peuvent servir à développer des hypothèses mécanistiques. Si le séquençage fait partie du protocole d'essai, la conception de l'essai fait l'objet d'une attention particulière, notamment en ce qui concerne le nombre de mutants séquencés par échantillon pour obtenir l'efficacité adéquate selon le modèle statistique utilisé (voir paragraphe 43).

DÉROULEMENT DE L'ESSAI**Nombre et sexe des animaux**

25. Un nombre suffisamment important d'animaux est prévu afin d'obtenir l'efficacité statistique nécessaire pour détecter une fréquence de mutants au moins multipliée par deux. Chaque groupe contient au moins 5 animaux; toutefois, si l'efficacité statistique est insuffisante, on utilise un plus grand nombre d'animaux, selon les besoins. On a normalement recours à des mâles. Dans certains cas, le recours exclusif à des femelles peut être justifié, par exemple si l'essai porte sur des médicaments qui concernent spécifiquement la femme dans l'espèce humaine, ou si l'étude porte spécifiquement sur le métabolisme féminin. En cas de différences significatives entre les sexes en matière de toxicité ou de métabolisme, on utilisera à la fois des mâles et des femelles.

Période d'administration

26. Sachant que les mutations s'accumulent au fil des traitements, un régime de doses répétées est nécessaire, à raison de traitements quotidiens pendant 28 jours. Cette démarche est généralement jugée acceptable à la fois pour produire une accumulation suffisante de mutations par des mutagènes faibles et pour fournir une durée d'exposition adéquate pour la détection des mutations dans les organes à prolifération lente. D'autres régimes de traitement peuvent être adaptés pour certaines évaluations, et il convient que ces autres calendriers de dosage soient scientifiquement justifiés dans le protocole. Les traitements ne sont pas plus courts que le temps nécessaire à l'induction complète de l'ensemble des enzymes impliquées dans les métabolismes mis en jeu, et les traitements de plus courte durée peuvent nécessiter le recours à des moments d'échantillonnage multiples, adaptés aux organes dont les taux de prolifération sont différents. Quel que soit le cas de figure, toutes les informations disponibles (par exemple celles sur la toxicité générale ou le métabolisme et la pharmacocinétique) sont exploitées lorsqu'il s'agit de justifier un protocole, en particulier lorsque ce dernier dévie des recommandations standard décrites précédemment. S'ils permettent certes d'accroître la sensibilité, les traitements de plus de 8 semaines sont expliqués clairement et justifiés, car des traitements de longue durée peuvent engendrer une augmentation apparente de la fréquence de mutants par expansion clonale (29).

Niveaux de doses

27. Les niveaux de doses sont déterminés à partir des résultats d'une étude préliminaire de détermination des concentrations mesurant la toxicité générale, menée selon la même voie d'exposition, ou à partir de résultats d'études de toxicité subaiguë existantes. Des animaux non transgéniques appartenant à la même souche de rongeur peuvent être utilisés pour déterminer ces ordres de grandeur. Dans l'essai principal, pour obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète comporte un groupe témoin négatif (voir paragraphe 22) et au moins trois niveaux de

▼ **M5**

doses espacés comme il se doit, sauf si la dose limite a été utilisée (voir paragraphe 28). La dose supérieure est la dose maximale tolérée (DMT). La DMT est définie comme la dose induisant des signes de toxicité tels que des niveaux de doses supérieurs à cette dose, dans les mêmes conditions d'administration, seraient susceptibles d'avoir des effets létaux. Les substances d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et les substances d'essai dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées peuvent être considérées comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évaluées au cas par cas. Les niveaux de doses employés sont compris entre «toxicité maximale» et «faible toxicité» voire «absence de toxicité».

Essai limite

28. Si les essais préliminaires de détermination des concentrations ou les données disponibles issues de souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (voir ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables, et si la génotoxicité n'est pas escomptée sur la base des données relatives aux substances structurellement apparentées, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire. Pour une période d'administration de 28 jours (soit 28 traitements quotidiens), la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour les périodes d'administration d'une durée inférieure ou égale à 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour (les calendriers de dosage autres que 28 traitements quotidiens font l'objet d'une justification scientifique dans le protocole; voir paragraphe 26).

Administration des doses

29. La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule de tubage adaptée. En général, la voie d'exposition humaine anticipée est prise en compte lors de la conception d'un essai. Par conséquent, les autres voies d'exposition (eau de boisson, sous-cutanée, intraveineuse, topique, inhalation, trachéale, alimentaire ou implantation, par exemple) peuvent être acceptables si elles peuvent être justifiées. Les injections intrapéritonéales ne sont pas recommandées, car la cavité péritonéale n'est pas une voie d'exposition humaine physiologiquement pertinente. Le volume maximal de liquide qu'on peut administrer par gavage ou par injection en une seule prise dépend de la taille de l'animal d'essai. Ce volume n'excède pas 2 ml/100 g de poids corporel. Le recours à des volumes plus importants fait l'objet de justification. Sauf pour les substances d'essai irritantes ou corrosives, qui auront normalement des effets exacerbés à des concentrations plus élevées, il convient de réduire la variabilité du volume d'essai par ajustement de la concentration pour garantir un volume constant à tous les niveaux de doses.

Moment d'échantillonnage*Cellules somatiques*

30. Le moment d'échantillonnage est une variable essentielle car elle dépend de la période nécessaire pour que les mutations se fixent. Cette période est différente selon les tissus et semble dépendre du temps de renouvellement de la population cellulaire, la moelle osseuse et les intestins répondant rapidement tandis que le foie répond beaucoup plus lentement. Une période de 28 jours de traitements consécutifs (tel qu'indiqué au paragraphe 26) et un échantillonnage 3 jours après le dernier traitement semblent un compromis acceptable pour l'évaluation des fréquences de mutants à la fois dans les tissus à prolifération rapide et dans ceux à prolifération lente, bien que la fréquence maximale de mutants puisse ne pas se manifester dans les tissus à prolifération lente dans ces conditions. Si les tissus à prolifération lente sont d'une importance cruciale, un moment d'échantillonnage 28 jours après la période d'administration de 28 jours peut se révéler mieux indiqué (16) (29). Dans ce cas-là, le moment d'échantillonnage 28 jours après remplace le moment d'échantillonnage 3 jours après et fait l'objet d'une justification scientifique.

▼ M5*Cellules germinales*

31. Les essais chez les RTG conviennent bien à l'étude de l'induction d'une mutation génétique chez les cellules germinales mâles (7) (8) (27), pour lesquelles la chronologie et la cinétique de la spermatogenèse ont été bien définies (27). Le nombre limité d'ovules disponibles pour l'analyse, même après une superovulation et le fait qu'il n'y ait pas de synthèse de l'ADN dans l'ovocyte empêchent de déterminer, via les essais transgéniques, si les cellules germinales femelles ont subi une mutation (31).

32. Le moment d'échantillonnage pour les cellules germinales mâles est choisi de telle sorte que la gamme de types de cellules exposées tout au long du cycle de développement des cellules germinales soit échantillonnée et que le stade ciblé dans le cadre de l'échantillonnage ait été suffisamment exposé. La progression des cellules germinales en développement du stade de cellules souches spermatogoniales au stade de sperme mature rejoignant le canal déférent/la queue de l'épididyme dure 49 jours environ chez la souris (36) et 70 jours environ chez le rat (34) (35). Le sperme collecté dans le canal déférent/la queue de l'épididyme après s'y être accumulé pendant une période d'exposition de 28 jours, suivie d'une période d'échantillonnage de 3 jours (7) (8), représente une population de cellules exposées durant approximativement la seconde moitié de la spermatogenèse, population composée de cellules méiotiques et postméiotiques mais pas de cellules spermatogoniales ni de cellules souches. Pour un bon échantillonnage des cellules du canal déférent/de la queue de l'épididyme qui étaient des cellules souches spermatogoniales pendant la période d'exposition, un moment d'échantillonnage supplémentaire à 7 semaines au minimum (souris) ou 10 semaines au minimum (rat) après la fin de traitement est nécessaire.

33. Les cellules expulsées des tubes séminifères au bout d'un régime de 28 jours + 3 jours sont composées d'une population mixte enrichie pour tous les stades des cellules germinales en développement (7) (8). L'échantillonnage de ces cellules pour la détection de mutations génétiques ne fournit pas une évaluation aussi précise des stades auxquels les mutations de cellules germinales sont induites que l'échantillonnage des spermatozoïdes du canal déférent/de la queue de l'épididyme (car toute une série de types de cellules germinales sont échantillonnés à partir des tubes et des cellules somatiques contaminent cette population cellulaire). Néanmoins, l'échantillonnage des cellules à partir des tubes séminifères allié à celui des spermatozoïdes collectés dans le canal déférent/la queue de l'épididyme au bout d'un régime de 28 jours + 3 jours d'échantillonnage permettrait de couvrir, dans une certaine mesure, les cellules exposées pendant la majorité des phases de développement des cellules germinales et serait utile pour la détection de certains des mutagènes agissant sur les cellules germinales.

Observations

34. Les animaux font 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 est consigné. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Chaque animal est pesé au moins une fois par semaine, et juste après avoir été sacrifié. La consommation alimentaire est mesurée au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est diluée dans de l'eau avant d'être administrée, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (23).

▼ M5**Collecte des tissus**

35. Les arguments invoqués pour justifier la collecte des tissus sont clairement définis. Étant donné qu'il est possible d'étudier l'induction de mutations quel que soit le tissu, ou presque, les tissus à collecter sont choisis en fonction des raisons qui ont motivé la conduite de l'étude et des données existantes relatives à la mutagénicité, à la cancérogénicité ou à la toxicité de la substance d'essai soumise à l'étude. La voie d'administration [basée sur la (les) voie(s) d'exposition humaine potentielle(s)], la distribution tissulaire prévue et le mécanisme d'action possible sont des facteurs importants à prendre en considération. En l'absence de documentation générale, plusieurs tissus somatiques sont collectés, selon l'intérêt qu'ils représentent. Il s'agira de tissus à prolifération rapide, de tissus à prolifération lente et de tissus appartenant au site de contact. En outre, les spermatozoïdes du canal déférent/de la queue de l'épididyme et les cellules germinales en développement des tubes séminifères (tel que décrits aux paragraphes 32 et 33) sont collectés et stockés au cas où l'analyse ultérieure de la mutagénicité des cellules germinales serait nécessaire. Les organes sont pesés, et pour les organes plus gros, la même zone est collectée sur tous les animaux.

Stockage des tissus et de l'ADN

36. Les tissus (ou homogénats de tissus) sont stockés à une température inférieure ou égale à -70 °C et utilisés pour l'isolement de l'ADN avant expiration d'un délai de 5 ans. L'ADN isolé, réfrigéré à une température de 4 °C dans un tampon approprié est idéalement utilisé pour l'analyse des mutations avant expiration d'un délai de 1 an.

Sélection des tissus pour l'analyse des mutants

37. Les tissus sont sélectionnés en fonction des critères suivants: 1) la voie d'administration ou le site de premier contact (estomac glandulaire en cas d'administration par voie orale, poumon en cas d'administration par inhalation ou peau en cas d'administration par voie topique, par exemple); 2) les paramètres pharmacocinétiques observés dans les études de toxicité générale; ils indiquent l'élimination ou la rétention par les tissus, l'accumulation dans les tissus, ou les organes cibles pour la toxicité. Si des études sont menées pour faire suite à des études de cancérogénicité, les tissus cibles pour la cancérogénicité sont pris en considération. La sélection des tissus à analyser doit optimiser la détection de produits chimiques qui sont des mutagènes *in vitro* à action directe, rapidement métabolisés, hautement réactifs ou faiblement absorbés, ou pour lesquels le tissu cible est déterminé par la voie d'administration (6).
38. En l'absence de documentation générale, et si l'on tient compte du site de contact en fonction de la voie d'administration, la mutagénicité du foie et d'au moins un tissu à division rapide (estomac glandulaire, moelle osseuse, par exemple) est évaluée. Dans la plupart des cas, ces exigences peuvent être respectées par des analyses de deux tissus soigneusement sélectionnés, mais, dans certains cas, trois tissus, voire plus, sont nécessaires. S'il y a des raisons d'être particulièrement préoccupé par des effets sur les cellules germinales, y compris en raison de réponses positives dans les cellules somatiques, les mutations dans les tissus de cellules germinales sont évaluées.

Méthodes de mesure

39. Des méthodes standard de laboratoire ou publiées conçues pour la détection des mutants sont à disposition des modèles transgéniques recommandés: bactériophage lambda et plasmide lacZ (30); souris lacI (2) (18); souris gpt delta (22); rat gpt delta (28); cII (17). Les modifications font l'objet d'une justification et sont accompagnées d'une documentation adéquate. Les données issues de multiples encapsidations peuvent être agrégées et utilisées pour atteindre un nombre de plages ou de colonies adéquat. Toutefois, le fait qu'un nombre important de réactions d'encapsidation soit nécessaire pour atteindre le nombre de plages approprié peut être un indicateur d'un ADN de faible qualité. Dans ces cas-là, la prudence s'impose, car les

▼ M5

données peuvent être dépourvues de fiabilité. Le nombre optimal de plages ou de colonies par échantillon d'ADN dépend de la probabilité statistique de détecter des mutants en nombre suffisant à une fréquence de mutants spontanés donnée. En général, un minimum de 125 000 à 300 000 plages est nécessaire si la fréquence de mutants spontanés est de l'ordre de 3×10^{-5} (15). Pour l'essai laCl (Big Blue®), il importe de démontrer que la gamme complète de phénotypes mutants de la couleur peut être détectée par inclusion de témoins de la couleur appropriée simultanément à chaque plage. Les tissus et les échantillons (items) qui en découlent sont traités et analysés selon un schéma par bloc où les items du groupe témoin véhicule/solvant, le groupe témoin positif (s'il y en a) ou l'ADN du témoin positif (s'il y a lieu) et chaque groupe de traitement sont traités ensemble.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Traitement des résultats**

40. Les résultats individuels pour chaque animal sont présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le rapport comporte le nombre total d'unités formant plage ou d'unités formant colonie, le nombre de mutants et la fréquence des mutants pour chaque tissu de chaque animal. En cas de réactions d'encapsidation/de récupération multiples, le nombre de réactions par échantillon d'ADN est consigné dans le rapport. S'il convient de conserver les données relatives à chaque réaction individuelle, seul le nombre total d'unités formant plage ou d'unités formant colonie est consigné par écrit. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 35 sont consignés dans le rapport. Les résultats du séquençage sont présentés pour chaque mutant analysé, et les calculs de la fréquence de mutation qui en résultent pour chaque animal et chaque tissu sont montrés.

Évaluation statistique et interprétation des résultats

41. Plusieurs critères, tels qu'une augmentation de la fréquence des mutants liée à la dose ou une nette augmentation de la fréquence des mutants dans un seul groupe traité par rapport au groupe témoin solvant/véhicule, permettent de déterminer un résultat positif. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse. Si la pertinence biologique des résultats est considérée comme prioritaire, des méthodes statistiques appropriées peuvent servir d'aide à l'évaluation des résultats d'essai (4) (14) (15) (25) (26). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.
42. Une substance d'essai dont les résultats ne remplissent pas les critères susmentionnés quel que soit le tissu est considérée comme non mutagène dans cet essai. Pour la pertinence biologique d'un résultat négatif, il convient que l'exposition du tissu soit confirmée.
43. Pour les analyses du séquençage de l'ADN, un certain nombre de méthodes statistiques aident à interpréter les résultats (1) (5) (9) (19).
44. Le fait d'examiner si les valeurs observées appartiennent ou non à l'ordre de grandeur traditionnel peut fournir des indications au moment de l'évaluation de la signification biologique de la réponse (32).

▼ M5**Rapport d'essai**

45. Le rapport d'essai devrait comporter les informations suivantes:

Substance chimique

- Données d'identification et n° CAS, s'il est connu
- Source, numéro de lot s'il est disponible
- État physique et pureté
- Propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'étude
- Stabilité de la substance d'essai, si elle est connue

Solvant/véhicule

- Justification du choix du véhicule
- Solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant ou véhicule, si elles sont connues
- Préparation des formulations pour administration par l'alimentation, par l'eau de boisson ou par inhalation
- Déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple)

Animaux d'expérience

- Espèce/souche utilisée et justification du choix
- Nombre, âge et sexe des animaux
- Source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.
- Poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris la gamme des poids, l'écart moyen et pondéré dans chaque groupe

Conditions expérimentales

- Données des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule)
- Données de l'étude préliminaire de détermination des concentrations
- Justification du choix des doses employées
- Détails concernant la formulation de la substance d'essai
- Détails concernant l'administration de la substance d'essai
- Justification du choix de la voie d'administration
- Méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel
- Méthodes permettant de vérifier que la substance d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs

▼ M5

- Dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) de la substance d'essai contenue dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu
- Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau
- Description détaillée des calendriers de traitement et d'échantillonnage et justification des choix
- Méthode d'euthanasie
- Procédures d'isolation et de préservation des tissus
- Méthodes d'isolation de l'ADN génomique des rongeurs, avec récupération du transgène de l'ADN génomique et transfert de l'ADN génomique vers un hôte bactérien
- Source et numéros de lot de toutes les cellules, matériels et de tous les réactifs (s'il y a lieu)
- Méthodes d'énumération des mutants
- Méthodes d'analyse moléculaire des mutants et utilisation comme correctifs pour la clonalité et/ou pour calculer les fréquences de mutation, s'il y a lieu

Résultats

- État général de l'animal avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité
- Poids corporels et poids des organes, après sacrifice
- Pour chaque tissu/animal, évaluation du nombre de mutants, du nombre de plages ou de colonies, fréquence des mutants
- Pour chaque groupe de tissus/animaux, nombre de réactions d'encapsulation par échantillon d'ADN, nombre total de mutants, fréquence moyenne des mutants, écart type
- Relation dose-réponse, si possible
- Pour chaque tissu/animal, nombre de mutants indépendants et fréquence moyenne de mutation si une analyse moléculaire des mutations a été menée
- Données sur les animaux témoins négatifs inclus simultanément dans l'essai et données antérieures sur ces témoins négatifs avec ordres de grandeur, moyennes et écarts types
- Données sur les animaux témoins positifs inclus simultanément dans l'essai (ou sur l'ADN d'animaux témoins positifs précédemment obtenus)
- Déterminations analytiques si elles existent (concentrations d'ADN utilisées dans l'encapsulation, données du séquençage ADN, par exemple)
- Analyses et méthodes statistiques employées

*Discussion des résultats**Conclusion*

▼ M5

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Adams, W.T., et Skopek, T.R. (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194:391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518:107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., Dollé, M.E., Martus, H.-J., Gossen, J.A., et Vijg, J. (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying in vivo Mutations', *Nature*, 377(6550):657-659
- (4) Carr, G.J., et Gorelick, N.J. (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3):246-255.
- (5) Carr, G.J., et Gorelick, N.J. (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen*, 28:405-413.
- (6) Dean, S.W., Brooks, T.M., Burlinson, B., Mirsalis, J., Myhr, B., Recio, L., et Thybaud, V. (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing in vivo for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1):141-151.
- (7) Douglas, G.R., Jiao, J., Gingerich, J.D., Gossen, J.A., et Soper, L.M. (1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of lacZ Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7485-7489.
- (8) Douglas, G.R., Gingerich, J.D., Soper, L.M., et Jiao, J. (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3):197-212.
- (9) Dunson, D.B., et Tindall, K.R. (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156:1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., de Leeuw, W.J., Tan, C.H., Zwarthoff, E.C., Berends, F., Lohman, P.H., Knook, D.L., et Vijg, J. (1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations in vivo', *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86(20):7971-7975.
- (11) Gossen, J.A., et Vijg, J. (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive E. coli Host', *Biotechniques*, 14(3):326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543:125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705:96-106.
- (14) Fung, K.Y., Douglas, G.R. et Krewski, D. (1998), 'Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3):249-255.
- (15) Heddle, J.A., Dean, S., Nohmi, T., Boerrigter, M., Casciano, D., Douglas, G.R., Glickman, B.W., Gorelick, N.J., Mirsalis, J.C., Martus, H.-J., Skopek, T.R., Thybaud, V., Tindall, K.R. et Yajima, N. (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35:253-259.
- (16) Heddle, J.A., Martus, H.-J., et Douglas, G.R. (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41:1-6.

▼ M5

- (17) Jakubczak, J.L., Merlino, G., French, J.E., Muller, W.J., Paul, B., Adhya, S., et Garges, S. (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for in vivo Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93(17):9073-9078.
- (18) Kohler, S.W., Provost, G.S., Kretz, P.L., Fieck, A., Sorge, J.A., et Short, J.M. (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8):212-218.
- (19) Lewis P.D., Manshian, B., Routledge, M.N., Scott, G.B. et Burns, P.A. (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4):772-778.
- (20) Nohmi, T., Katoh, M., Suzuki, H., Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M., Suzuki, M., Horiya, N., Ueda, O., Shibuya, T., Ikeda, H., et Sofuni, T. (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi- and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4):465-470.
- (21) Nohmi, T., Suzuki, M., Masumura, K., Yamada, M., Matsui, K., Ueda, O., Suzuki, H., Katoh, M., Ikeda, H., et Sofuni, T. (1999), 'Spi- Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1):9-15.
- (22) Nohmi, T., Suzuki, T., et Masumura, K.I. (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1-2):191-215.
- (23) 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, OCDE, Paris.*
- (24) OCDE (2009), *Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, No. 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OCDE, Paris.*
- (25) Piegorsch, W.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Johnson, A., French, J.E., Tennant, R.W., et Tindall, K.R. (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3):231-245.
- (26) Piegorsch, W.W., Lockhart, A.C., Carr, G.J., Margolin, B.H., Brooks, T., Douglas, G.R., Liegibel, U.M., Suzuki, T., Thybaud, V., van Delft, J.H., et Gorelick, N.J. (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', *Mutation. Res.*, 388(2-3):249-289.
- (27) Singer, T.M., Lambert, I.B., Williams, A., Douglas, G.R., et Yauk, C.L. (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation. Res.*, 598:164-193.
- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., Inoue, T., Masumura, K., Hayashi, H., Kawamura, Y., Kurata, Y., Takamune, M., Yamada, M., Sanada, H., Umemura, T., Nishikawa, A., et Nohmi, T. (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1):71-78.
- (29) Thybaud, V., Dean, S., Nohmi, T., de Boer, J., Douglas, G.R., Glickman, B.W., Gorelick, N.J., Heddle, J.A., Heflich, R.H., Lambert, I., Martus, H.-J., Mirsalis, J.C., Suzuki, T., et Yajima, N. (2003), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540:141-151.
- (30) Vijg, J., et Douglas, G.R. (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations in vivo', in Pfeifer, G. (ed), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II, Plenum Press, New York, NY, USA, p. 391-410.*

▼ **M5**

- (31) Yauk, C.L., Gingerich, J.D., Soper, L., MacMahon, A., Foster, W.G., et Douglas, G.R. (2005), 'A lacZ Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1-2):117-123.
- (32) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., et Thybaud, V. (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
- (33) OCDE (2011), Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, No. 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OCDE, Paris.
- (34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonia! renewal', *Physiol. Rev.*, 52:198-236.
- (35) Robaire, B., Hinton, B.T., et Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., et Wassarman, P. M (eds), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, Pays-Bas, p. 1071-1148.
- (36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122:25-36.

▼ **M5***Appendice*

DÉFINITIONS

Capside: structure protéinique qui entoure une particule virale.

Concatémère: longue biomolécule continue constituée de multiples copies identiques répétées en série.

Décalage du cadre de lecture: mutation génétique provoquée par des insertions ou des délétions de nucléotides dont le nombre n'est pas un multiple de trois dans la séquence d'ADN qui code une protéine ou un peptide.

Délétion: mutation induisant une perte d'une partie du génome allant d'un à plusieurs nucléotides (séquentiels).

Délétions importantes: délétions de l'ADN dont le nombre est supérieur à plusieurs kilobases (les essais de sélection du gène Spi⁻ et de plasmides du gène lacZ permettent de les détecter efficacement).

Efficacité de l'encapsidation: efficacité avec laquelle les bactériophages encapsidés sont retrouvés dans la bactérie hôte.

Électroporation: envoi d'impulsions électriques qui améliorent la perméabilité membranaire des cellules.

Encapsidation: synthèse de particules phagiques infectieuses issues d'une préparation à base de capsides et de queues protéiques de phages et d'un concatémère de molécules d'ADN de phages. Technique fréquemment utilisée pour introduire l'ADN cloné et véhiculé par un vecteur lambda (séparé par des sites cos) à l'intérieur des particules lambda infectieuses.

Expansion clonale: production de nombreuses cellules à partir d'une seule cellule (mutante).

Gène endogène: gène qui prend sa source dans le génome.

Gène neutre: gène non soumis aux pressions de la sélection positive ou négative.

Gène rapporteur: gène dont le produit (gène mutant) est facilement détecté.

Insertion: ajout d'une ou de plusieurs paires de bases nucléotidiques dans une séquence d'ADN.

Jackpot: apparition d'un nombre important de mutants à la suite d'une expansion clonale à partir d'une seule mutation.

Ligature: formation d'une liaison covalente entre deux extrémités de molécules d'ADN par l'ADN ligase.

Mitogène: substance qui aide une cellule à entamer sa division cellulaire, provoquant ainsi la mitose (ou division cellulaire).

Moment d'échantillonnage: moment qui marque la fin de la période antérieure au sacrifice de l'animal, au cours de laquelle la substance d'essai n'est pas administrée et au cours de laquelle les lésions d'ADN non réparées se fixent sous forme de mutations stables.

Mutation ponctuelle: terme générique désignant une mutation qui affecte seulement une petite séquence d'ADN (petites insertions, délétions et substitutions d'une base par une autre).

Période d'administration: période totale au cours de laquelle un animal se voit administrer la substance d'essai.

Sélection positive: méthode permettant uniquement aux mutants de survivre.

Site cos: segment d'ADN simple brin possédant 12 nucléotides, présent aux deux extrémités du génome double brin du bactériophage lambda.

▼ M5

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Substitution d'une paire de bases: type de mutation qui engendre le remplacement d'un nucléotide à une seule base par un autre nucléotide d'ADN.

Transgénique: qualifie un être vivant issu d'un organisme ou un organisme dont le génome a été modifié par l'introduction d'un ou de plusieurs gènes d'une autre espèce.

Unité formant colonie (UFC): unité utilisée pour dénombrer les bactéries viables.

Unité formant plaque (UFP): unité utilisée pour dénombrer les bactériophages viables.

Variation extrabinomiale: variabilité des estimations répétées d'une proportion de population plus importante que ce qui pourrait être escompté si la population avait une distribution binomiale.

Vecteur navette: vecteur dont la structure lui permet de se propager dans deux espèces hôtes différentes; ainsi, l'ADN introduit dans un vecteur navette peut être testé ou manipulé dans deux types de cellules différents ou dans deux organismes différents.

«B.59 Sensibilisation cutanée in chemico: essai de réactivité peptidique direct (DPRA)

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 442C (2015) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ⁽¹⁾. La présente méthode d'essai décrit une procédure *in chemico*, à savoir l'essai de réactivité peptidique direct (*Direct Peptide Reactivity Assay*, DPRA), qui doit aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH et le CLP.

Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) (2) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la dermatite de contact allergique chez l'homme ou l'hypersensibilité de contact chez les rongeurs, en passant par les étapes intermédiaires. Dans l'AOP relative à la sensibilisation cutanée, l'événement moléculaire initiateur est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau.

Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques — test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et test de Buehler, également chez le cobaye [méthode d'essai B.6 (3)]— portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Un essai sur la souris, l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) [méthode d'essai B.42 (4)], et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA [méthode d'essai B.50 (5)] et l'ELGL: BrdU-ELISA [méthode d'essai B.51 (6)], tous trois portant sur la réponse à l'induction exclusivement, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

Plus récemment, des méthodes d'essai *in chemico* et *in vitro* de type mécanistique ont été considérées comme scientifiquement valides pour l'évaluation du danger de sensibilisation cutanée lié aux produits chimiques. Cependant des combinaisons de méthodes de substitution à l'expérimentation animale (méthodes *in silico*, *in chemico*, *in vitro*) seront nécessaires, dans le cadre des approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), pour qu'il soit possible de remplacer les essais sur l'animal actuellement pratiqués, compte tenu de la restriction de chacune de ces méthodes pour ce qui est de la couverture mécanistique de l'AOP (2) (7).

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

Le DPRA est proposé pour l'étude de l'événement moléculaire initiateur dans l'AOP sensibilisation cutanée, nommément la réactivité protéique, par quantification de la réactivité des produits chimiques testés vis-à-vis de modèles peptidiques de synthèse contenant soit de la lysine, soit de la cystéine (8). Les taux de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite utilisés pour classer les substances dans l'une des quatre classes de réactivité, afin d'aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés (9).

Le DPRA a fait l'objet d'une étude de validation du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM), suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) de ce laboratoire, qui a considéré le DPRA comme scientifiquement valide (10), dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation de la méthode d'essai DPRA combinée à d'autres sources d'information (11) (12) (13) (14).

Les définitions sont données à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

La corrélation entre la réactivité aux protéines et le pouvoir de sensibilisation cutanée est bien établie (15) (16) (17). Cependant, étant donné que la liaison aux protéines n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée, même s'il s'agit de l'événement moléculaire initiateur, les données relatives à la réactivité aux protéines obtenues par des méthodes expérimentales et non expérimentales ne sont généralement pas suffisantes à elles seules pour conclure à l'absence de pouvoir de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Il convient donc de considérer les données issues de l'application de la présente méthode d'essai dans le contexte d'une approche intégrée de type IATA, en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais *in vitro* portant sur d'autres phases de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (*read-across*) relatives à des produits chimiques similaires.

La présente méthode d'essai peut apporter une aide, en combinaison avec d'autres sources d'information complémentaires, à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA). Cette méthode d'essai ne peut pas être utilisée seule, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH/CLP, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, un résultat positif peut être considéré comme suffisant à lui seul pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/CLP.

La transférabilité de la méthode d'essai DPRA à des laboratoires expérimentés dans le domaine de la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) a été démontrée. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par la méthode d'essai sont de l'ordre de 85 % intra-laboratoire et 80 % inter-laboratoires (10). Dans l'ensemble, les résultats issus de l'étude de validation (18) et des études publiées (19) montrent que la précision de la méthode DPRA pour distinguer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH/CLP) des non-sensibilisants est de 80 % (N=157), pour une sensibilité de 80 % (88/109) et une spécificité de 77 % (37/48), par comparaison avec les résultats obtenus par l'ELGL (*LLNA* en anglais). La méthode DPRA est susceptible de sous-prédire des produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau faible à modéré (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) par rapport aux produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau élevé (c'est-à-dire sous-catégorie 1A) du SGH/CLP (18) (19). Cependant, les valeurs relatives à la précision du DPRA utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées au paragraphe 9 ci-dessus. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain. Les données actuellement disponibles montrent que le DPRA est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (8) (9) (10) (19). L'ensemble de ces données montre l'utilité du DPRA comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée.

Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé, et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode DPRA aux substances et/ou aux mélanges. La présente méthode d'essai n'est pas applicable à l'essai des composés métalliques, qui sont connus pour réagir avec les protéines par des mécanismes autres que la liaison covalente. Les produits chimiques d'essai doivent être solubles dans un solvant approprié à une concentration finale de 100 mM (voir paragraphe 18). Toutefois, les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent être testés à des concentrations plus basses auxquelles ils sont solubles. Dans ce cas, un résultat positif pourra quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité du DPRA à des mélanges de composition connue (18) (19). On considère néanmoins que le DPRA est techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges de composition connue (voir paragraphe 18). Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à une exigence réglementaire. Le modèle prédictif actuel n'est pas applicable aux mélanges complexes de composition inconnue ni aux substances de composition inconnue ou variable, aux produits de réaction complexes ou aux matériels biologiques (substances UVCB), compte tenu des quotients molaires définis entre le produit chimique d'essai et le peptide. Pour ces produits, il sera nécessaire de mettre au point un nouveau modèle prédictif fondé sur une approche gravimétrique. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode d'essai ne peut s'appliquer à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester les catégories en question.

La présente méthode d'essai est une méthode *in chemico*, qui ne fait pas intervenir de système métabolique. Elle ne permet pas d'identifier les produits chimiques requérant une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée (pro-haptènes). Dans certains cas, les produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) apparaissent comme correctement identifiés par la méthode d'essai (18). A la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs obtenus par la méthode d'essai devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et en lien avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. Les produits chimiques qui ne se lient pas de façon covalente au peptide mais qui facilitent son oxydation (p.ex. la dimerisation de la cystéine) peuvent amener à une surestimation potentielle de la déplétion en peptide, pouvant mener à un résultat faussement positif et/ou une assignation du produit chimique d'essai à une classe de réactivité supérieure (voir paragraphes 29 et 30).

Comme indiqué, la méthode DPRA aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (11). Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats du DPRA pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation

PRINCIPE DE L'ESSAI

Le DPRA est une méthode *in chemico* qui quantifie la concentration résiduelle de peptide contenant de la cystéine ou de la lysine après 24 heures d'incubation avec le produit chimique d'essai à $25 \pm 2,5$ °C. Les peptides de synthèse contiennent de la phénylalanine destinée à faciliter la détection. La concentration peptidique relative est mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec élution par gradient et détection UV à 220 nm. Les pourcentages de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite établis par calcul et utilisés dans un modèle prédictif (voir paragraphe 29) qui permet d'assigner le produit chimique d'essai à l'une des quatre classes de réactivité utilisées pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve énumérées à l'appendice 2.

MODE OPÉRATOIRE

La présente méthode d'essai est basée sur le protocole DPRA DB-ALM n° 154 (20), qui est celui utilisé pour l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM. Il est recommandé d'utiliser ce protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de la méthode au laboratoire. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires du DPRA. Dans le cas où un autre système CLHP était utilisé, l'équivalence de ce système par rapport à celui validé dans le protocole DPRA DB-ALM devra être démontrée (p.ex. en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 2).

Préparation des peptides contenant de la cystéine ou de la lysine

Des solutions mères de cystéine (Ac-RFAACAA-COOH) et de lysine (Ac-RFAAKAA-COOH) contenant des peptides de synthèse de pureté supérieure à 85 %, et de préférence de l'ordre de 90-95 %, doivent être fraîchement préparées avant d'être incubées avec le produit chimique d'essai. La concentration finale du peptide à cystéine doit être de 0,667 mM dans un tampon phosphate de pH 7,5, la concentration finale du peptide à lysine de 0,667 mM dans un tampon acétate d'ammonium de pH 10,2. Les séquences d'analyse CLHP doivent être programmées avec pour objectif que le temps de l'analyse CLHP ne dépasse pas 30 heures. Dans le cas du système CLHP utilisé lors de l'étude de validation et décrit dans la présente méthode d'essai, jusqu'à 26 échantillons (comprenant le produit chimique d'essai, le témoin positif et un nombre approprié de solvants témoins, selon le nombre de solvants utilisés dans l'essai, chaque échantillon étant testé en triplicat) peuvent être analysés dans le même passage dans le système CLHP. Tous les réplicats analysés en un même passage doivent utiliser les mêmes solutions mères de peptide à cystéine et à lysine. Il est recommandé d'avoir la preuve de la solubilité des lots individuels de peptides avant leur utilisation.

Préparation du produit chimique d'essai

La solubilité du produit chimique d'essai dans un solvant approprié sera évaluée avant la conduite de l'essai, conformément au mode opératoire décrit dans le protocole DPRA DB-ALM pour la solubilisation (20). Un solvant approprié est un solvant qui dissout complètement le produit chimique d'essai. Dans le DPRA, le produit chimique d'essai est incubé en large excès avec les peptides à cystéine ou à lysine; une inspection visuelle de la solution formée est donc considérée comme suffisante pour vérifier que le produit chimique d'essai (et tous ses composants, dans le cas d'essais portant sur une substance multi-constituants ou un mélange) est bien dissous. Les solvants appropriés sont l'acétonitrile, l'eau, un mélange 1:1 eau:acétonitrile, l'isopropanol, l'acétone ou un mélange 1:1 acétone:acétonitrile. D'autres solvants peuvent être utilisés à condition qu'ils n'aient pas d'incidence sur la stabilité du peptide, d'après les essais réalisés sur des témoins de référence C (échantillons constitués du peptide seul dissous dans le solvant approprié; voir appendice 3). Une dernière option, si le produit chimique d'essai n'est soluble dans aucun de ces solvants, consiste à tenter de le solubiliser dans 300 µL de DMSO et de diluer la solution ainsi obtenue avec 2 700 µL d'acétonitrile; si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans ce mélange, on tentera de solubiliser la même quantité de produit chimique d'essai dans 1 500 µL de DMSO et de diluer la solution obtenue avec 1 500 µL d'acétonitrile. Le produit chimique d'essai doit être pré-pesé dans des flacons en verre, et dissous immédiatement avant l'essai dans un solvant approprié pour préparer une solution à 100 mM. Pour les mélanges et les substances multi-constituants de composition connue, un seul degré de pureté est établi d'après la somme des pourcentages relatifs de leurs constituants (à l'exception de l'eau) et une seule masse moléculaire apparente est établie à partir de la masse moléculaire de chacun des constituants du mélange (à l'exception de l'eau) et de leurs proportions respectives. La pureté et la masse moléculaire apparente obtenues sont alors utilisées pour calculer le poids de produit chimique d'essai nécessaire pour préparer une solution à 100 mM. Dans le cas des polymères pour lesquels il n'est pas possible d'établir une masse moléculaire prédominante, la masse moléculaire du monomère (ou la masse moléculaire apparente des divers monomères constituant le polymère) pourra être prise en compte pour préparer une solution à 100 mM. Cependant, lors de tests sur les mélanges, les substances multi-constituants ou les polymères de compositions connues, on devra envisager de tester aussi le produit chimique pur. Pour les liquides, le produit chimique pur devra être testé tel quel sans dilution préalable, en l'incubant dans des proportions de 1:10 et 1:50 (rapport molaire) avec les peptides lysine et cystéine, respectivement. Pour les solides, le produit chimique devra être dissous à sa concentration maximale de solubilité dans le même solvant utilisé pour la préparation de la solution à 10mM apparents. Le produit chimique devra alors être testé ainsi sans aucune autre dilution en l'incubant dans des proportions de 1:10 et 1: 50 avec les peptides lysine et cystéine, respectivement. Des résultats concordants (réactif ou non réactif) entre la solution à 100 mM apparents et le produit chimique pur devraient permettre de formuler une conclusion définitive.

Préparation du témoin positif, des témoins de référence et des témoins de co-élution

L'aldéhyde cinnamique (n°CAS 104-55-2; pureté grade alimentaire $\geq 95\%$) est utilisé comme témoin positif (TP) à une concentration de 100 mM dans l'acétonitrile. D'autres témoins positifs adaptés, donnant de préférence des valeurs de déplétion situées dans une fourchette moyenne, peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptabilité comparables pour la séquence. En outre, des témoins de référence (échantillons contenant uniquement le peptide dissous dans le solvant approprié) doivent aussi être inclus dans la séquence d'analyse CLHP; ils permettent de s'assurer avant l'analyse que le système CLHP est adapté à l'usage prévu (témoins de référence A), de vérifier la stabilité des témoins de référence dans le temps (témoins de référence B) et de vérifier que le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai n'a pas d'incidence sur le pourcentage de déplétion des peptides (témoins de référence C) (voir appendice 3). Un témoin de référence approprié est utilisé pour chaque produit chimique afin de calculer le pourcentage de déplétion des peptides lié à cette substance (voir paragraphe 26). De plus, pour chaque produit chimique analysé, un témoin de co-élution constitué du seul produit chimique sera inclus dans la séquence afin de détecter une éventuelle co-élution du produit chimique d'essai avec le peptide à lysine ou à cystéine.

Incubation du produit chimique d'essai avec les solutions de peptide à cystéine et à lysine

Les solutions de peptide à cystéine et à lysine sont mises en incubation avec le produit chimique d'essai dans des flacons en verre pour auto-échantillonneur, dans des proportions de 1:10 et 1:50 respectivement. Si un précipité est observé dès l'ajout de la solution de produit chimique d'essai à la solution de peptide, du fait d'une faible hydrosolubilité du produit chimique d'essai, on ne peut savoir avec certitude quelle est la quantité de produit chimique d'essai restant dans la solution et susceptible de réagir avec le peptide. Dans ce cas, un résultat positif pourra être utilisé, mais un résultat négatif présentera une incertitude et devra être interprété avec prudence (voir également les provisions citées au paragraphe 11 dans le cadre d'essai avec des produits chimiques non solubles à une concentration finale de 100 mM). La solution de réaction doit être maintenue dans l'obscurité à $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ pendant 24 ± 2 heures avant l'analyse CLHP. Chaque produit chimique d'essai doit être analysé en triplicat pour les deux peptides. Une inspection visuelle des échantillons est nécessaire avant l'analyse CLHP. Si un précipité ou une séparation de phases sont observés, il est prudent de centrifuger les échantillons à vitesse modérée (100-400xg) afin d'entraîner le précipité au fond du flacon, un excès de précipité risquant de colmater les tubes ou les colonnes du chromatographe. Dans le cas où une précipitation ou une séparation de phases sont observées à la fin de la période d'incubation, la déplétion des peptides peut être sous-estimée et un résultat négatif ne permettra pas de conclure avec une certitude suffisante à l'absence de réactivité.

Préparation de la courbe d'étalonnage CLHP

Une courbe d'étalonnage doit être établie pour le peptide à cystéine et le peptide à lysine. Les étalons de peptides sont préparés dans une solution à 20 % ou 25 % acétonitrile:tampon, avec un tampon phosphate (pH 7,5) pour le peptide à cystéine et un tampon acétate d'ammonium (pH 10,2) pour le peptide à lysine. À partir d'étalons obtenus par dilution en série de la solution mère de peptide (0,667 mM), 6 solutions d'étalonnage sont préparées entre 0,34 et 0,0167 mM. Un blanc constitué du tampon de dilution doit être inclus dans la courbe d'étalonnage. Une courbe d'étalonnage adaptée aura un coefficient $r^2 > 0,99$.

Préparation et analyse CLHP

Il convient de vérifier avant la conduite de l'analyse si le système est adapté à l'usage prévu. La déplétion de peptides est mesurée par CLHP couplée à un détecteur UV (détecteur à barrette de photodiodes ou détecteur à absorbance UV de longueur d'onde fixe égale à 220 nm). La colonne appropriée est installée dans le système CLHP. L'installation CLHP décrite dans le protocole validé utilise de préférence une colonne Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 microns. Avec cette colonne CLHP à phase inverse, l'ensemble du système doit être

équilibré à 30 °C avec 50 % de phase A (0.1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'eau) et 50 % de phase B (0,085 % (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile) pendant 2 heures au moins avant la conduite de l'analyse. L'analyse CLHP doit être réalisée à un débit de 0,35 ml/min pour un gradient linéaire allant de 10 % à 25 % d'acétonitrile pendant 10 minutes, suivi d'une augmentation rapide jusqu'à 90 % d'acétonitrile pour éliminer les autres matériaux. Des volumes égaux de chaque étalon, échantillon et témoin doivent être injectés. La colonne doit être ré-équilibrée aux conditions initiales pendant 7 minutes entre les injections. Si une colonne CLHP à phase inverse d'un modèle différent est utilisée, il peut être nécessaire d'ajuster les paramètres ci-dessus pour assurer une élution et une intégration appropriées des peptides à cystéine et à lysine, en particulier le volume injecté, qui peut varier selon le système utilisé (habituellement entre 3 et 10 µl). Il est essentiel, si des paramètres CLHP différents sont utilisés, de démontrer qu'ils sont équivalents au paramétrage validé décrit ci-dessus (par des essais sur les substances d'épreuve de compétence de l'appendice 2, par exemple). L'absorbance est mesurée à 220 nm. Si un détecteur à barrette de photodiodes est utilisé, l'absorbance à 258 nm doit également être relevée. On notera que certains lots d'acétonitrile peuvent avoir une incidence négative sur la stabilité des peptides, qui doit être évaluée lorsqu'un nouveau lot d'acétonitrile est utilisé. Le rapport entre la surface du pic à 220 nm et la surface du pic à 258 nm peut servir d'indicateur de co-élution. Pour chaque échantillon, un rapport compris entre 90 et 100 % de la moyenne⁽¹⁾ des rapports des surfaces obtenue pour les échantillons témoins constitue un bon indicateur de l'absence de co-élution.

Certains produits chimiques d'essai peuvent promouvoir l'oxydation du peptide à cystéine. Le pic du peptide à cystéine dimérisé peut être observé visuellement. S'il apparaît qu'une dimérisation s'est produite, il convient de le noter, car le pourcentage de déplétion du peptide peut être surestimé, amenant à une prédiction faussement positive et/ou une assignation à une classe de réactivité supérieure (voir paragraphes 29 et 30).

L'analyse CLHP des peptides à cystéine et des peptides à lysine peut être réalisée le même jour, si l'on dispose de deux systèmes CLHP. Si les deux analyses ne sont pas réalisées le même jour, toutes les solutions de produit chimique d'essai doivent être chaque fois fraîchement préparées pour l'essai. L'analyse doit être programmée dans le temps de telle sorte que l'injection du premier échantillon commence 22 à 26 heures après le mélange du produit chimique d'essai avec la solution de peptide. Les séquences d'analyse CLHP doivent être programmées dans le souci de maintenir le temps d'analyse en-deçà de 30 heures. Dans le cas du système CLHP utilisé dans l'étude de validation et décrit dans la présente méthode d'essai, un maximum de 26 échantillons peuvent être analysés lors d'un même passage dans le système CLHP (voir aussi paragraphe 17). On trouvera à l'appendice 3 un exemple de séquence d'analyse CLHP.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

On établit de manière photométrique à 220 nm pour chaque échantillon, la concentration de peptide à lysine ou à cystéine, en mesurant la surface des pics appropriés par intégration des pics (tout ce qui se situe sous la courbe) et en calculant la concentration peptidique d'après la courbe d'étalonnage linéaire établie à partir des étalons.

On établit pour chaque échantillon le pourcentage de déplétion des peptides en mesurant la surface des pics et en la divisant par la surface moyenne des pics des témoins de référence C correspondants (voir appendice 3) selon la formule ci-après.

$$\text{Pourcentage de déplétion des peptides} = \left[1 - \left(\frac{\text{Surface du pic peptidique pour le réplikat}}{\text{Surface moyenne des pics peptidiques des témoins de référence C}} \right) \right] \times 100$$

Critères d'acceptabilité

Les critères suivants doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide:

- a) la courbe d'étalonnage doit avoir un coefficient $r^2 > 0,99$;

⁽¹⁾ Le terme de «moyenne», dans le présent document, est entendu au sens de «moyenne arithmétique».

- b) le pourcentage moyen de déplétion des peptides des trois réplicats pour le témoin positif à l'aldéhyde cinnamique doit se situer entre 60,8 % et 100 % pour le peptide à cystéine et entre 40,2 % et 69 % pour le peptide à lysine, et l'écart type maximal pour les réplicats du témoin positif doit être < 14,9 % pour le taux de déplétion de la cystéine et < 11,6 % pour le taux de déplétion de la lysine;
- c) la concentration peptidique moyenne des témoins de référence A doit être de $0,50 \pm 0,05$ mM et le coefficient de variation (CV) des surfaces des pics peptidiques doit être < 15,0 % pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile.

Si un seul ou plusieurs de ces critères ne sont pas remplis, l'essai doit être répété.

Les critères suivants doivent être remplis pour que les résultats relatifs à un produit chimique d'essai soient considérés comme valides:

- a) l'écart type maximal pour les réplicats du produit chimique d'essai doit être < 14,9 % pour le taux de déplétion de la cystéine et < 11,6 % pour le taux de déplétion de la lysine,
- b) la concentration peptidique moyenne des trois témoins de référence C dans le solvant approprié doit être de $0,50 \pm 0,05$ mM. Si ces critères ne sont pas remplis, les données doivent être rejetées et l'essai doit être répété pour le produit chimique d'essai considéré.

Modèle prédictif

Le pourcentage moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine est calculé pour chaque produit chimique d'essai. Une déplétion négative est considérée comme égale à 0 pour le calcul de la moyenne. Si l'on utilise le modèle prédictif cystéine 1:10/lysine 1:50 du tableau 1, c'est le seuil de 6,38 % de déplétion peptidique moyenne qui sera pris en compte pour l'identification des sensibilisants et des non-sensibilisants cutanés dans le cadre d'une approche IATA. L'application du modèle prédictif pour assigner un produit chimique d'essai à une classe de réactivité (réactivité faible, modérée ou forte) permettra peut-être d'obtenir des informations utiles pour évaluer la puissance de sensibilisation de ce produit chimique dans le cadre d'une approche de type IATA.

Tableau 1

Modèle prédictif ⁽¹⁾ cystéine 1:10/ lysine 1:50

Pourcentage moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine	Classe de réactivité	Prediction DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ % moyen de déplétion ≤ 6,38 %	Réactivité nulle ou minimale	Négative
6,38 % < % moyen de déplétion ≤ 22,62 %	Faible réactivité	Positive
22,62 % < % moyen de déplétion ≤ 42,47 %	Réactivité modérée	
42,47 % < % moyen de déplétion ≤ 100 %	Forte réactivité	

⁽¹⁾ Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.

⁽²⁾ Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 12.

Il peut arriver que le produit chimique d'essai (la substance, ou l'un ou plusieurs des composants d'une substance multi-constituants ou d'un mélange) donne lieu à une absorption significative à 220 nm et ait le même temps de rétention que le peptide (co-élution). La co-élution peut être résolue par un léger ajustement du système d'analyse CLHP afin de mieux séparer les temps de rétention entre le produit chimique d'essai et le peptide. Si un autre système d'analyse CLHP est employé dans l'objectif de résoudre cette problématique de co-élution, son équivalence au système CLHP validé dans la présente ligne directrice devra être démontrée (p.ex. au moyen des substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 2) Dans les cas de co-élution, le pic du peptide ne peut pas être intégré, et il n'est pas possible de calculer le pourcentage de déplétion des peptides. Si la co-élution pour ce produit chimique d'essai concerne à la fois les peptides à cystéine et à lysine, l'analyse est considérée comme «non concluante». Si la co-élution n'intervient que pour le peptide à lysine, le modèle prédictif du tableau 2 pour la cystéine 1:10 est applicable.

Tableau 2

Modèle prédictif ⁽¹⁾ cystéine 1:10

Pourcentage de déplétion de la cystéine (Cys)	Classe de réactivité	Prédiction DPRA (?)
0 % ≤ % déplétion Cys ≤ 13,89 %	Réactivité nulle ou minimale	Négative
13,89 % < % déplétion Cys ≤ 23,09 %	Faible réactivité	Positive
23,09 % < % déplétion Cys ≤ 98,24 %	Réactivité modérée	
98,24 % < % déplétion Cys ≤ 100 %	Forte réactivité	

(¹) Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.

(²) Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 12.

Il peut également y avoir des cas où les temps de rétention du produit chimique d'essai et de l'un des peptides ne se recouvrent pas complètement. Les pourcentages de déplétion peuvent alors être estimés et utilisés dans le modèle prédictif cystéine 1:10/lysine 1:50, sans qu'il soit possible de classer avec précision le produit chimique d'essai dans l'une des classes de réactivité.

Pour un produit chimique d'essai, une seule analyse CLHP pour le peptide à cystéine et le peptide à lysine devrait suffire si le résultat est sans équivoque. Cependant, lorsque les données disponibles pour déterminer si un résultat limite est positif ou négatif sont proches du seuil, des tests complémentaires peuvent être nécessaires. Si le pourcentage moyen de déplétion se situe dans l'intervalle 3 % à 10 % pour la cystéine 1:10/lysine 1:50, ou si le pourcentage de déplétion de la cystéine se situe dans l'intervalle 9 % à 17 % pour la cystéine 1:10, une deuxième analyse doit être envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

— Substance mono-constituant:

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

- Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
 - Concentration(s) testée(s);
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:
- Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
 - Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
 - Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
 - Concentration(s) testée(s);
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins

- Témoin positif
- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;
 - Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
 - Concentration(s) testée(s);
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
 - Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Solvant/véhicule
- Solvant/véhicule utilisé et teneur de chacun de ses constituants, s'il y a lieu;
 - Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
 - Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants / véhicules autres que ceux mentionnés dans la méthode d'essai sont utilisés, et selon les données disponibles;
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

- Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai;
- Pour l'acétonitrile, résultats du test d'impact sur la stabilité des peptides.

Préparation des peptides, du témoin positif et du produit chimique d'essai

- Caractérisation des solutions peptidiques (fournisseur, lot, poids exact de peptide, volume ajouté pour préparer la solution mère);
- Caractérisation de la solution contenant le témoin positif (poids exact de substance témoin, volume ajouté pour préparer la solution d'essai);
- Caractérisation des solutions de produit chimique d'essai (poids exact de produit chimique d'essai, volume ajouté pour préparer la solution d'essai).

Paramètres et analyse CLHP

- Type de système CLHP, colonne CLHP et colonne de garde, détecteur, auto-échantillonneur;
- Paramètres pertinents pour l'analyse CLHP, tels que la température de la colonne, les volumes injectés, le débit et le gradient.

Adéquation du système

- Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat d'étalon et de témoin de référence A;
- Représentation graphique des courbes d'étalonnage linéaires et indication de leur coefficient r^2 ;
- Concentration peptidique de chaque réplicat du témoin de référence A;
- Concentration peptidique moyenne (mM) des trois témoins de référence A, écart type et coefficient de variation;
- Concentration peptidique des témoins de référence A et C.

Séquence d'analyse

- Pour les témoins de référence:
 - Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat B et C;
 - Aire moyenne des pics peptidiques à 220 nm pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile, écart type et coefficient de variation (vérification de la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse);
 - Pour chaque solvant utilisé, aire moyenne des pics peptidiques à 220 nm pour les trois témoins de référence C appropriés (pour le calcul du pourcentage de déplétion des peptides);
 - Pour chaque solvant utilisé, concentration peptidique (mM) pour les trois témoins de référence C appropriés;
 - Pour chaque solvant utilisé, concentration peptidique moyenne (mM) pour les trois témoins de référence C appropriés, écart type et coefficient de variation.
- Pour le témoin positif:
 - Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat;
 - Pourcentage de déplétion des peptides pour chaque réplicat;
 - Taux moyen de déplétion des peptides pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation.
- Pour chaque produit chimique d'essai:
 - Apparence du précipité dans le mélange de réaction à la fin du temps d'incubation, s'il y a lieu. Indiquer si le précipité a été re-solubilisé ou centrifugé;

- Présence d'une co-élution;
- Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu;
- Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat;
- Pourcentage de déplétion des peptides pour chaque réplicat;
- Pourcentage moyen de déplétion des peptides pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation;
- Pourcentages moyens de déplétion pour la cystéine et pour la lysine;
- Modèle prédictif utilisé et prédiction DPRA.

Épreuves de compétence

- S'il y a lieu, les procédures utilisées pour démontrer la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour démontrer une application reproductible dans le temps de la méthode d'essai.

Discussion des résultats

- Discussion des résultats obtenus par la méthode d'essai DPRA;
- Discussion des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n° 168. OCDE, Paris.
- (3) Chapitre B.6 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée.
- (4) Chapitre B.42 de la présente annexe: Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques
- (5) Chapitre B.50 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: DA.
- (6) Chapitre B.51 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BrdU-ELISA
- (7) Adler S *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Accessible à l'adresse suivante: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *Journal of Applied Toxicology*, publié en ligne, 14 mai 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
 - (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609-618.
 - (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
 - (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
 - (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
 - (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
 - (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible à l'adresse suivante: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
 - (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, publié en ligne, 9 avril 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
 - (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible à l'adresse suivante: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
 - (21) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série sur les essais et l'évaluations, n° 34. Organisation pour la coopération et le développement économiques, Paris.
 - (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible à l'adresse suivante: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138
 - (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

Appendice 1

DEFINITIONS

Chemical: A substance or a mixture.

Adéquation du système: Détermination des performances des instruments (sensibilité, par exemple) par l'analyse d'un étalon de référence préalablement à la mise à l'épreuve du lot analytique (22).

AOP (*Adverse Outcome Pathway*, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables): séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (2).

Coefficient de variation: la mesure de la variabilité calculée pour un groupe de données issues de réplicats en divisant la déviation standard par la moyenne. Cette mesure peut être multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage.

Courbe d'étalonnage: Relation entre la réponse expérimentale et la concentration analytique (aussi appelée *courbe étalon*) d'une substance d'essai connue.

Danger: Propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

Événement moléculaire initiateur: Perturbation d'un système biologique induite par un produit chimique au niveau moléculaire, identifiée comme le point de départ de la voie impliquée dans un effet indésirable (AOP).

Fiabilité: Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (21).

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation): Approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

Mélange: Mélange ou solution constitué(e) de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles (1).

Méthode d'essai validée: Méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle puisse être jugée acceptable pour l'objectif envisagé (21).

Pertinence: Décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) de la méthode d'essai (21).

Précision: Étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (21).

Produit chimique: une substance ou un mélange

Produit chimique d'essai: Le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé.

Reproductibilité: Accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (21).

Sensibilité: Proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (21).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: Proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont classés correctement par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (21).

Substance: Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (1).

Substance mono-constituant: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (P/P).

Substance multi-constituants: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (P/P). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

Témoin de référence: Échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou le véhicule utilisé pour préparer les échantillons traités ou non avec le produit chimique d'essai, et servant à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concomitant, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du témoin positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Appendice 2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in chemico*: essai de réactivité peptidique direct (DPRA)

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant les prédictions attendues par la méthode DPRA pour les 10 substances d'épreuve de compétence recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de déplétion de la cystéine et de la lysine se situant dans les domaines de référence respectifs de ces deux grandeurs pour au moins 8 des 10 substances d'épreuve de compétence. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, la qualité élevée des données de référence *in vivo* disponibles et des données *in vitro* obtenues par le DPRA, ainsi que l'utilisation de ces substances dans l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM pour démontrer que la méthode d'essai a été mise en œuvre avec succès dans les laboratoires participant à l'étude.

Tableau 1

Substances d'épreuve recommandées pour démontrer les compétences techniques des laboratoires relatives à l'essai réactivité peptidique direct (DPRA)

Substances d'épreuve de compétence	N°CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> (1)	Prédiction DPRA (2)	Intervalle de variation (3) du % de déplétion du peptide à cystéine	Intervalle de variation (3) du % de déplétion du peptide à lysine
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	60-80	10-55
Formaldéhyde	50-00-0	Liquide	Sensibilisant (fort)	Positive	30-60	0-24
Benzylidène-acétone	122-57-6	Solide	Sensibilisant (modéré)	Positive	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	15-55	0-25
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	0-7	0-5,5
6-Méthylcoumarine	92-48-8	Solide	Non-sensibilisant	Negative	0-7	0-5,5

Substances d'épreuve de compétence	N°CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Prédiction DPRA ⁽²⁾	Intervalle de variation ⁽³⁾ du % de déplétion du peptide à cystéine	Intervalle de variation ⁽³⁾ du % de déplétion du peptide à lysine
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	0-7	0-5,5
4-Méthoxyacétophénone	100-06-1	Solide	Non-sensibilisant	Négative	0-7	0-5,5

⁽¹⁾ La prédiction *in vivo* des dangers (et de la puissance sensibilisante) est fondée sur les données ELGL (19). La puissance *in vivo* est déterminée à partir de critères proposés par ECETOC (23).

⁽²⁾ Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 11.

⁽³⁾ Intervalles déterminés sur la base d'au moins 10 valeurs de déplétion établies par 6 laboratoires indépendants.

Appendice 3

EXEMPLE DE SÉQUENCE D'ANALYSE

Étalons et témoins de référence	Étalon 1 Étalon 2 Étalon 3 Étalon 4 Étalon 5 Étalon 6 Tampon de dilution Témoin de référence A, rép. 1 Témoin de référence A, rép. 2 Témoin de référence A, rép. 3
Témoins de co-élution	Témoin de co-élution pour le produit chimique d'essai 1 Témoin de co-élution pour le produit chimique d'essai 2
Témoins de référence	Témoin de référence B, rép. 1 Témoin de référence B, rép. 2 Témoin de référence B, rép. 3
Première série de répliqués	Témoin de référence C, rép. 1 Aldéhyde cinnamique, rép. 1 Échantillon 1, rép. 1 Échantillon 2, rép. 1
Deuxième série de répliqués	Témoin de référence C, rép. 2 Aldéhyde cinnamique, rép. 2 Échantillon 1, rép. 2 Échantillon 2, rép. 2
Troisième série de répliqués	Témoin de référence C, rép. 3 Aldéhyde cinnamique, rép. 3 Échantillon 1, rép. 3 Échantillon 2, rép. 3
Témoins de référence	Témoin de référence B, rép. 4 Témoin de référence B, rép. 5 Témoin de référence B, rép. 6

Trois séries de témoins de référence (échantillons constitués seulement de peptide dissous dans le solvant approprié) doivent être incluses dans la séquence d'analyse:

Témoin de référence A: utilisé pour vérifier l'adéquation du système CLHP.

Témoin de référence B: inclus au début et à la fin de la séquence d'analyse pour vérifier la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse.

Témoin de référence C: inclus dans la séquence d'analyse pour vérifier que le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai n'a pas d'incidence sur le pourcentage de déplétion des peptides.

B.60 Sensibilisation cutanée *in vitro*: méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 442D (2015) de l'OCDE. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) (1). La présente méthode d'essai décrit une procédure *in vitro* (essai ARE-Nrf2 luciférase) qui doit aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH (1) et le CLP.

Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) (2) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la dermatite de contact allergique chez l'homme ou l'hypersensibilité de contact chez les rongeurs (2) (3), en passant par les étapes intermédiaires. L'événement moléculaire initiateur est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Le deuxième événement clé sur cet AOP se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des phénomènes d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE, *Antioxidant Response Element*). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques, habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule, les chimiokines et les cytokines. Le quatrième événement clé est la prolifération des lymphocytes T, évaluée indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (4).

Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques — test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Klignman et test de Buehler, également chez le cobaye [méthode d'essai B.6 (5)] — portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Un essai sur la souris, l'ELGL [méthode d'essai B.42 (4)], et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA (méthode d'essai B.50 (6)) et l'ELGL: BrDU-ELISA [méthode d'essai B.51 (7)], tous trois portant exclusivement sur la réponse à l'induction, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

Plus récemment, des méthodes d'essai *in chemico* et *in vitro* de type mécanistique ont été considérées comme scientifiquement valides pour l'évaluation du danger de sensibilisation cutanée lié aux produits chimiques. Cependant des combinaisons de méthodes de substitution à l'expérimentation animale (méthodes *in silico*, *in chemico*, *in vitro*) seront nécessaires, dans le cadre des approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), pour qu'il soit possible de remplacer complètement les essais sur l'animal actuellement pratiqués, compte tenu de la restriction de chacune de ces méthodes pour ce qui est de la couverture mécanistique de l'AOP (2) (3).

La présente méthode d'essai (essai ARE-Nrf2 luciférase) est proposée pour l'étude de la deuxième étape décrite au paragraphe 2. Les sensibilisants cutanés ont été signalés comme provoquant l'induction de gènes qui sont régulés par l'élément de réponse antioxydant (ARE) (8) (9). Des substances électrophiles de petite taille telles que les sensibilisants cutanés peuvent agir sur la protéine détectrice Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), par exemple par une modification covalente de son résidu cystéine l'amenant à se dissocier du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Le facteur Nrf2 dissocié peut alors activer les gènes dépendants de l'ARE, tels que ceux qui codent les enzymes détoxifiantes de phase II (8) (10) (11).

A l'heure actuelle, le seul essai ARE-Nrf2 luciférase *in vitro* couvert par la présente méthode d'essai est l'essai KeratinoSens™, qui a donné lieu à des études de validation (9) (12) (13) suivies d'un examen indépendant par des pairs, conduit par le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (14). L'essai KeratinoSens™ a été considéré comme scientifiquement valide, dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins de classification et d'étiquetage des dangers (14). Les laboratoires souhaitant appliquer cette méthode d'essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante utilisée dans l'essai KeratinoSens™ en établissant un accord de licence avec le développeur de la méthode (15).

(1) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

Les définitions sont données à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

L'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE ne concernant que la deuxième étape de l'AOP relative à la sensibilisation cutanée, les informations obtenues à l'aide de méthodes d'essai fondées sur l'activation de cette voie ne sont peut-être pas suffisantes à elles seules, pour établir le potentiel de sensibilisation cutanée de produits chimiques. Il convient donc de considérer les données issues de l'application de la présente méthode d'essai dans le contexte d'une approche intégrée de type IATA, en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais *in vitro* portant sur d'autres étapes-clé de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (*read-across*) relatives à des produits chimiques similaires. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase combinée à d'autres sources d'information (13) (16) (17) (18) (19).

La présente méthode d'essai peut apporter une aide à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA). Cette méthode d'essai ne peut pas être utilisée seule, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH/CLP optionnelles, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, un résultat positif peut être considéré comme suffisant à lui seul pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH/CLP.

D'après l'ensemble des données issues de l'étude de validation et des tests pratiqués en interne lors de l'examen indépendant de la méthode d'essai par des pairs, la méthode KeratinoSens™ est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions est de l'ordre de 85 % intra- et inter-laboratoires (14). Par ailleurs, l'exactitude (77 % -155/201), la sensibilité (78 % — 71/91) et la spécificité (76 % — 84/110) des prédictions obtenues par l'essai KeratinoSens™ pour déterminer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH/CLP) des non-sensibilisants, comparées aux résultats de l'ELGL, ont été calculées en prenant en compte toutes les données soumises à l'EURL ECVAM pour l'évaluation et l'examen par des pairs (14). Ces chiffres sont similaires à ceux récemment publiés à l'issue d'essais en interne portant sur quelque 145 substances chimiques (précision 77 %, sensibilité 79 %, spécificité 72 %) (13). L'essai KeratinoSens™ est susceptible de sous-prédire des produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau faible à modéré (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) par rapport aux produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau élevé (c'est-à-dire sous-catégorie 1A) du SGH/CLP (13) (14). L'ensemble de ces données montre l'utilité de l'essai KeratinoSens™ comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode reposant uniquement sur l'essai KeratinoSens™ n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées au paragraphe 9 ci-dessus. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain.

Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé, et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase aux substances et/ou aux mélanges. Les données actuellement disponibles montrent que l'essai KeratinoSens™ est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (9) (12) (13) (14). Ce sont principalement des substances mono-constituant qui ont été testées, même si l'on dispose également d'un nombre limité de données relatives à l'essai de mélanges (20). La méthode est néanmoins techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à une exigence réglementaire. De plus, en cas d'essai portant sur des substances multi-constituants ou des mélanges, il convient de s'interroger sur l'interférence possible de constituants cytotoxiques avec les réponses observées. La méthode d'essai est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant en formant plusieurs phases) dans l'eau ou dans le DMSO (cela vaut pour tous les constituants du produit chimique d'essai si l'essai porte sur une substance multi-constituants ou un mélange). Les produits chimiques d'essai

qui ne remplissent pas ces conditions à la concentration finale maximale requise de 2 000 µM (cf. paragraphe 22) peuvent néanmoins être testés à des concentrations plus faibles. Dans ce cas, les résultats remplissant les critères de positivité décrits au paragraphe 39 peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, tandis qu'un résultat négatif obtenu pour des concentrations < 1 000 µM sera considéré comme non concluant (voir le modèle prédictif au paragraphe 39). D'une manière générale, les substances ayant un LogP calculé inférieur ou égal à 5 ont été testés avec succès, alors que les substances extrêmement hydrophobes dont le LogP calculé est supérieur à 7 se situent en dehors des limites connues d'applicabilité de la méthode d'essai (14). Pour les substances ayant un LogP calculé compris entre 5 et 7, les informations disponibles sont limitées.

Les résultats négatifs sont à interpréter avec prudence, car les substances réactives exclusivement vis-à-vis des résidus lysine peuvent être identifiées comme négatives par la méthode d'essai. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (21), ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (produits chimiques nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (produits chimiques activés par auto-oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs. À l'inverse, les produits chimiques d'essai qui n'agissent pas comme des sensibilisants, mais sont néanmoins des facteurs de stress chimique, peuvent donner lieu à des faux positifs (14). De plus, lorsque les produits chimiques d'essai sont fortement cytotoxiques, ils ne peuvent pas toujours être évalués de façon fiable. Enfin, les produits chimiques d'essai qui interfèrent avec la luciférase peuvent créer un risque de confusion avec l'activité de la luciférase, dans les essais au niveau cellulaire, en provoquant soit une inhibition apparente soit une luminescence accrue (22). Ainsi, il a été signalé que des concentrations de phyto-œstrogènes supérieures à 1 µM interféraient avec les signaux de luminescence, dans d'autres essais avec gènes rapporteurs faisant intervenir la luciférase, du fait d'une suractivation du gène rapporteur de la luciférase (23). Il convient donc d'examiner attentivement l'expression de la luciférase obtenue à des concentrations élevées de phyto-œstrogènes ou de produits chimiques similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur de la luciférase comparable à celle résultant des phyto-œstrogènes (23). Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode d'essai ne peut s'appliquer à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester les catégories en question.

Outre qu'elle aide à distinguer les sensibilisants cutanés et des non-sensibilisants, la méthode KeratinoSens™ fournit sur la relation concentration-réponse des informations susceptibles de contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation, dans le cadre d'une approche intégrée IATA (19). Cependant, une étude complémentaire s'appuyant de préférence sur des données humaines fiables sera nécessaire pour déterminer de quelle façon les résultats de l'essai KeratinoSens™ peuvent contribuer à l'évaluation de la puissance (24) et à la sous-catégorisation des sensibilisants selon le SGH/CLP.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase utilise une lignée de cellules adhérentes immortalisées dérivées de kératinocytes humains HaCaT transfectés de façon stable avec un plasmide sélectionnable. Cette lignée cellulaire contient le gène de la luciférase sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur constitutif fusionné à un élément ARE d'un gène connu pour l'intensification de son expression sous l'effet de sensibilisants cutanés (25) (26). Le signal de la luciférase reflète l'activation par les sensibilisants de gènes endogènes dépendants du facteur Nrf2, et la dépendance du signal de la luciférase vis-à-vis de Nrf2 dans la lignée cellulaire recombinante a été démontrée (27). Cela permet la mesure quantitative (par détection de luminescence) de l'induction du gène de la luciférase, grâce à l'utilisation de substrats de luciférase produisant une luminescence satisfaisante, comme indicateur de l'activité du facteur de transcription Nrf2 dans les cellules après exposition à des substances électrophiles.

Dans l'essai KeratinoSens™, les produits chimiques d'essai sont considérés comme positifs s'ils provoquent une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase dépassant un seuil donné (c.à.d. supérieure à 1,5 fois, soit 50 % d'augmentation, dans la méthode KeratinoSens™), au-dessous d'une concentration donnée n'affectant pas significativement la viabilité de la cellule (au-dessous de 1 000 µM, par exemple, et à une concentration pour laquelle la viabilité cellulaire est supérieure à 70 % dans la méthode KeratinoSens™ (9) (12)). On établit à cet effet le facteur maximal (I_{max}) par lequel est multipliée l'induction de l'activité de la luciférase par rapport au témoin (négatif) de solvant. De plus, les cellules étant exposées à une série de concentrations du produit chimique d'essai, la concentration nécessaire pour obtenir une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase au-delà du seuil (c.à.d. la valeur $CE_{1,5}$ dans le cas de la méthode KeratinoSens™) devra être interpolée à partir de la courbe dose-réponse (voir paragraphe 32 pour la méthode de calcul). Enfin, des mesures de cytotoxicité devront être réalisées en parallèle pour déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase survient à des concentrations sub-cytotoxiques.

Avant d'utiliser en routine l'essai ARE-Nrf2 luciférase conformément à la présente méthode d'essai, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances énumérées à l'appendice 2.

Des normes de performance (28) ont été établies pour faciliter la validation de méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase *in vitro* nouvelles ou modifiées similaires à l'essai KeratinoSens™, et permettre de modifier rapidement la présente méthode d'essai afin de les y intégrer. L'acceptation mutuelle des données conformément à l'accord de l'OCDE ne sera garantie pour les méthodes d'essai validées conformément aux normes de performance que si ces méthodes d'essai ont été examinées et incorporées dans la ligne directrice correspondante par l'OCDE.

MODE OPÉRATOIRE

La seule méthode actuellement couverte par la présente méthode d'essai est l'essai scientifiquement validé KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Les modes opératoires normalisés pour l'essai KeratinoSens™ sont disponibles et il convient de les appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai au laboratoire (15). Les laboratoires souhaitant appliquer cette méthode d'essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante utilisée dans l'essai KeratinoSens™ en établissant un accord de licence avec le développeur de la méthode. On trouvera dans les paragraphes qui suivent une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase.

Préparation des cultures de kératinocytes

Il convient d'utiliser une lignée de cellules transgéniques comportant une insertion stable du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'élément ARE (lignée cellulaire KeratinoSens™). A réception, les cellules sont multipliées (2 à 4 repiquages, par exemple) afin de former un stock homogène conservé à l'état congelé. Les cellules provenant de ce stock d'origine peuvent être multipliées jusqu'à un nombre maximum de repiquages (25, dans la méthode KeratinoSens™) et peuvent ensuite être employées pour des essais de routine moyennant l'utilisation d'un milieu d'entretien approprié (DMEM additionné de sérum et de généticine, dans la méthode KeratinoSens™).

Pour les essais, les cellules doivent présenter une confluence de 80-90 %, et il convient de veiller à ce qu'elles n'arrivent jamais à confluence complète. Une journée avant l'essai, les cellules sont récoltées et réparties dans des plaques 96 puits (10 000 cellules/puits dans la méthode KeratinoSens™). On veillera à éviter la sédimentation des cellules durant l'ensemencement, afin d'assurer une distribution homogène du nombre de cellules entre les puits. Si ce n'est pas le cas, cette étape peut donner lieu à une forte variabilité entre puits. Pour chaque répétition, trois réplicats sont utilisés pour mesurer l'activité de la luciférase, et un réplicat parallèle est utilisé pour le test de viabilité cellulaire.

Préparation du produit chimique d'essai et des substances témoins

Le produit chimique d'essai et les substances témoins sont préparés le jour du test. Dans l'essai KeratinoSens™, les produits chimiques d'essai sont dissous dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) à la concentration finale souhaitée (200 mM, par exemple). Les solutions de DMSO peuvent être considérées comme auto-stérilisantes, si bien qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une filtration stérile. Les produits chimiques d'essai qui ne sont pas solubles dans le DMSO sont dissous dans de l'eau stérile ou un milieu de culture, et les solutions sont stérilisées, par exemple par filtration. Pour un produit chimique d'essai n'ayant pas de masse moléculaire (MM) définie, une solution mère est préparée à une concentration par défaut (40 mg/ml ou 4 % (m/v) dans l'essai KeratinoSens™). Dans le cas où des solvants autres que le DMSO, l'eau ou le milieu de culture sont utilisés, une justification suffisamment scientifique devra être fournie.

A partir des solutions mères du produit chimique d'essai dans le DMSO, des dilutions en série sont préparées avec du DMSO pour obtenir 12 concentrations de référence du produit chimique à tester (de 0,098 à 200 mM dans l'essai KeratinoSens™). Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le DMSO, les dilutions permettant d'obtenir les concentrations de référence sont réalisées avec de l'eau stérile ou un milieu de culture stérile. Indépendamment du solvant utilisé, les concentrations de référence sont ensuite diluées 25 fois dans un milieu de culture contenant du sérum, et utilisées finalement pour le traitement après une nouvelle dilution d'un facteur 4, si bien que les concentrations finales du produit chimique d'essai vont de 0,98 à 2 000 µM, dans l'essai KeratinoSens™. Il est possible d'utiliser d'autres concentrations si cela est justifié (dans le cas d'un produit cytotoxique ou peu soluble, par exemple).

Le témoin (de solvant) négatif utilisé dans l'essai KeratinoSens™ est le DMSO (n°CAS 67-68-5, pureté ≥99 %), pour lequel six puits sont préparés par plaque. Il est soumis à une dilution identique à celle décrite au paragraphe 22 pour les concentrations de référence, de telle sorte que la concentration finale du témoin (de solvant) négatif est de 1 %, connue pour ne pas affecter la viabilité cellulaire (soit la même concentration de DMSO que dans le produit chimique testé et dans le témoin positif). Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le DMSO et a été dilué dans l'eau, la concentration de DMSO dans tous les puits de la solution d'essai finale doit être ajustée à 1 %, comme pour les autres produits chimiques d'essai et substances témoins.

Le témoin positif utilisé dans l'essai KeratinoSens™ est l'aldéhyde cinnamique (n°CAS 14371-10-9, pureté ≥98 %), pour lequel une série de 5 concentrations de référence allant de 0,4 à 6,4 mM sont préparées dans le DMSO (à partir d'une solution mère à 6,4 mM) et diluées selon la procédure décrite au paragraphe 22 pour les concentrations de référence, si bien que la concentration finale du témoin positif se situe entre 4 et 64 µM. D'autres témoins positifs adaptés, donnant de préférence une CE_{1,5} située dans la fourchette des valeurs moyennes, peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptation issus de procédures comparables.

Application du produit chimique d'essai et des substances témoins

Pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin positive, une expérience est nécessaire pour dériver une prédiction (positive ou négative), comportant au minimum deux répétitions indépendantes portant chacune sur trois réplicats (soit n = 6). En cas de résultats discordants entre les deux répétitions indépendantes, une troisième répétition portant sur trois réplicats (soit n = 9) devra être effectuée. Chaque répétition indépendante est effectuée à un jour différent au moyen d'une solution-mère de produit chimique d'essai, et de cellules collectées de façon indépendante. Les cellules peuvent cependant être issues du même repiquage.

Après ensemencement selon le mode opératoire décrit au paragraphe 20, les cellules sont mises en culture pendant 24 heures dans les plaques de microtitrage 96 puits. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu de culture frais (150 µl de milieu de culture contenant du sérum mais dépourvu de généticine dans l'essai KeratinoSens™) additionné de 50 µl du produit chimique d'essai et des substances témoins dilués 25 fois. Au moins un puits par plaque doit être laissé vide (sans cellules ni traitement) afin de déterminer les valeurs de fond.

Les plaques traitées sont ensuite mises en incubation pendant environ 48 heures à 37°C ± 1°C sous 5 % de CO₂ dans l'essai KeratinoSens™. Il convient d'éviter l'évaporation des produits chimiques d'essai volatils, ainsi que les contaminations croisées entre puits par les produits chimiques d'essai, en couvrant par exemple les plaques d'une feuille protectrice avant l'incubation avec les produits chimiques d'essai.

Mesure de l'activité de la luciférase

Trois facteurs sont déterminants pour une lecture correcte de la luminescence:

- le choix d'un luminomètre sensible,
- l'utilisation d'un format de plaques de hauteur suffisante pour éviter une contamination croisée par la lumière, et
- l'utilisation d'un substrat de luciférase émettant suffisamment de lumière pour assurer une sensibilité satisfaisante et une faible variabilité.

Avant l'essai, un test sera réalisé selon le mode opératoire décrit à l'appendice 3 afin de vérifier que ces trois exigences sont remplies.

Après 48 heures d'exposition au produit chimique d'essai et aux substances témoins dans l'essai KeratinoSens™, les cellules sont lavées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate, et le tampon de lyse approprié pour la lecture de la luminescence est ajouté à chaque puits pour une durée de 20 minutes à température ambiante.

Les plaques contenant le lysat cellulaire sont ensuite placées pour lecture dans le luminomètre qui est programmé, dans l'essai KeratinoSens™, pour: (i) ajouter dans chaque puits le substrat de luciférase (50 µl), (ii) attendre une seconde, puis (iii) intégrer l'activité de la luciférase pendant 2 secondes. Si des paramètres différents sont utilisés compte tenu, par exemple, du modèle de luminomètre utilisé, il convient de les justifier. De plus, un substrat rayonnant peut également être utilisé, dans la mesure ou le contrôle de la qualité de l'expérience remplit les critères décrits à l'Appendice 3.

Évaluation de la cytotoxicité

Pour le test de viabilité cellulaire KeratinoSens™, le milieu est remplacé, après les 48 heures d'exposition, par du milieu frais contenant du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de thiazolyl tétrazolium bleu; n°CAS 298-93-1) et les cellules sont mises en incubation pendant 4 heures à 37°C sous 5 % de CO₂. Le milieu contenant du MTT est alors retiré et les cellules sont lysées pendant la nuit (p.ex. par ajout de solution SDS à 10 % dans chaque puits). Après agitation, l'absorption est mesurée à 600 nm au photomètre.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

Les paramètres suivants sont calculés dans l'essai KeratinoSens™:

- valeur maximale moyenne de l'induction de l'activité de la luciférase (I_{\max}), pour chaque concentration du produit chimique d'essai et du témoin positif;
- valeur de $CE_{1,5}$, représentant la concentration pour laquelle une induction de l'activité de la luciférase est supérieure au seuil de 1,5 fois (soit une activité augmentée de 50 %) a été obtenue; et
- concentrations CI_{50} et CI_{30} correspondant à une réduction de 50 % et 30 % de la viabilité cellulaire.
- L'équation 1 permet de calculer le facteur multiplicatif de l'induction de l'activité de la luciférase, et la valeur résultante maximale de l'induction (I_{\max}) est la moyenne de chacune des répétitions.

Équation 1:

$$\text{Facteur multiplicatif de l'induction} = \frac{(L_{\text{échantillon}} - L_{\text{blanc}})}{(L_{\text{solvant}} - L_{\text{blanc}})}$$

où

$L_{\text{échantillon}}$ est la luminescence mesurée dans le puits contenant le produit chimique d'essai

L_{blanc} est la luminescence mesurée dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

L_{solvant} est la valeur moyenne de la luminescence mesurée dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant (négatif)

$CE_{1,5}$ est calculée par interpolation linéaire d'après l'équation 2, et la valeur résultante de l' $CE_{1,5}$ est la moyenne géométrique de chacune des répétitions.

Équation 2:

$$CE_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

où

C_a est la concentration la plus faible, en μM , provoquant une augmentation de l'induction $> 1,5$ fois

C_b est la concentration la plus forte, en μM , provoquant une augmentation de l'induction $< 1,5$ fois

I_a est la multiplication de l'induction mesurée à la concentration la plus faible donnant une augmentation de l'induction $> 1,5$ fois (moyenne de trois puits réplicats)

I_b est la multiplication de l'induction mesurée à la concentration la plus forte donnant une augmentation de l'induction $< 1,5$ fois (moyenne de trois puits réplicats)

L'équation 3 permet de calculer la viabilité:

Équation 3:

$$\text{Viabilité} = \frac{(V_{\text{échantillon}} - V_{\text{blanc}})}{V_{\text{solvant}} - V_{\text{blanc}}} \times 100$$

où

$V_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans le puits contenant le produit chimique d'essai

V_{blanc} est l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

V_{solvant} est la valeur moyenne de l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant (négatif)

CI_{50} et CI_{30} sont calculés par interpolation linéaire d'après l'équation 4, et les valeurs résultantes de CI_{50} et CI_{30} sont les moyennes géométriques de chacune des répétitions.

Équation 4:

$$CI_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

où

X est la réduction en % à la concentration qui doit être établie par calcul (50 et 30 pour CI_{50} et CI_{30})

C_a est la concentration la plus faible en μM pour laquelle la réduction de viabilité est $> x$ %

C_b est la concentration la plus forte en μM pour laquelle la réduction de viabilité est $< x$ %

V_a est la viabilité en % à la concentration la plus faible pour laquelle la réduction de viabilité est $> x$ %

V_b est la viabilité en % à la concentration la plus forte pour laquelle la réduction de viabilité est $< x$ %

Pour chaque concentration donnant une augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase $> 1,5$ fois, on calcule la signification statistique (par un test t de Student bilatéral, par exemple) en comparant la luminescence pour les trois échantillons réplicats avec la luminescence pour les puits contenant le témoin de solvant (négatif), afin de déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase est statistiquement significative ($p < 0,05$). La concentration la plus faible pour laquelle l'augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase est $> 1,5$ fois est la valeur déterminant $CE_{1,5}$. On vérifie dans chaque cas si cette valeur est inférieure à CI_{30} , et donc si la réduction de la viabilité cellulaire est bien inférieure à 30 % à la concentration déterminant $CE_{1,5}$.

Il est recommandé de vérifier visuellement les données à l'aide de graphiques. En l'absence de courbe dose-réponse clairement observable, ou si la courbe dose-réponse obtenue est biphasique (c'est-à-dire qu'elle croise deux fois le seuil de 1,5), il convient de répéter l'expérience pour vérifier si ce résultat est spécifique au produit chimique d'essai ou s'il s'agit d'un artefact expérimental. Dans le cas où la réponse biphasique est reproductible au cours d'un essai indépendant, c'est la valeur $CE_{1,5}$ la plus basse (la concentration à laquelle la courbe croise le seuil de 1,5 pour la première fois) qui doit être consignée dans le rapport.

Dans les rares cas où l'on observe une induction statistiquement non significative supérieure à 1,5 fois, suivie d'une induction statistiquement significative à une concentration plus élevée, les résultats de cette répétition ne sont considérés comme valides et positifs que si une induction statistiquement significative supérieure au seuil de 1,5 a été obtenue à une concentration non cytotoxique.

Enfin, pour les produits chimiques d'essai générant une augmentation de l'induction égale ou supérieure à 1,5 fois pour la concentration testée la plus faible de 0,98 μM , la valeur de $CE_{1,5}$ est fixée à $< 0,98$ sur la base d'un examen visuel de la courbe dose-réponse.

Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de l'essai KeratinoSens™. Premièrement, l'induction de l'activité de la luciférase obtenue avec le témoin positif (aldéhyde cinnamique) doit être significativement supérieure au seuil de 1,5 (d'après un test T, par exemple) pour au moins l'une des concentrations testées (de 4 à 64 μM).

Deuxièmement, la valeur de $CE_{1,5}$ doit se situer dans un intervalle de deux écarts types autour de la moyenne historique du laboratoire (entre 7 μM et 30 μM , par exemple, d'après les données utilisées pour la validation), qui devra être actualisée régulièrement. De plus, l'induction moyenne des trois réplicats pour l'aldéhyde cinnamique à 64 μM doit se situer entre 2 et 8. Si ce dernier critère n'est pas rempli, la relation dose-réponse pour l'aldéhyde cinnamique devra être vérifiée avec soin, et les tests ne pourront être acceptés que s'il existe une relation dose-réponse claire, l'induction de l'activité de la luciférase augmentant avec la concentration pour le témoin positif.

Enfin, le coefficient moyen de variation de la luminescence pour le témoin (de solvant) négatif DMSO doit être inférieur à 20 % pour chaque répétition qui comprend 6 puits testés en triplicats. Si la variabilité est supérieure, les résultats ne doivent pas être pris en compte.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

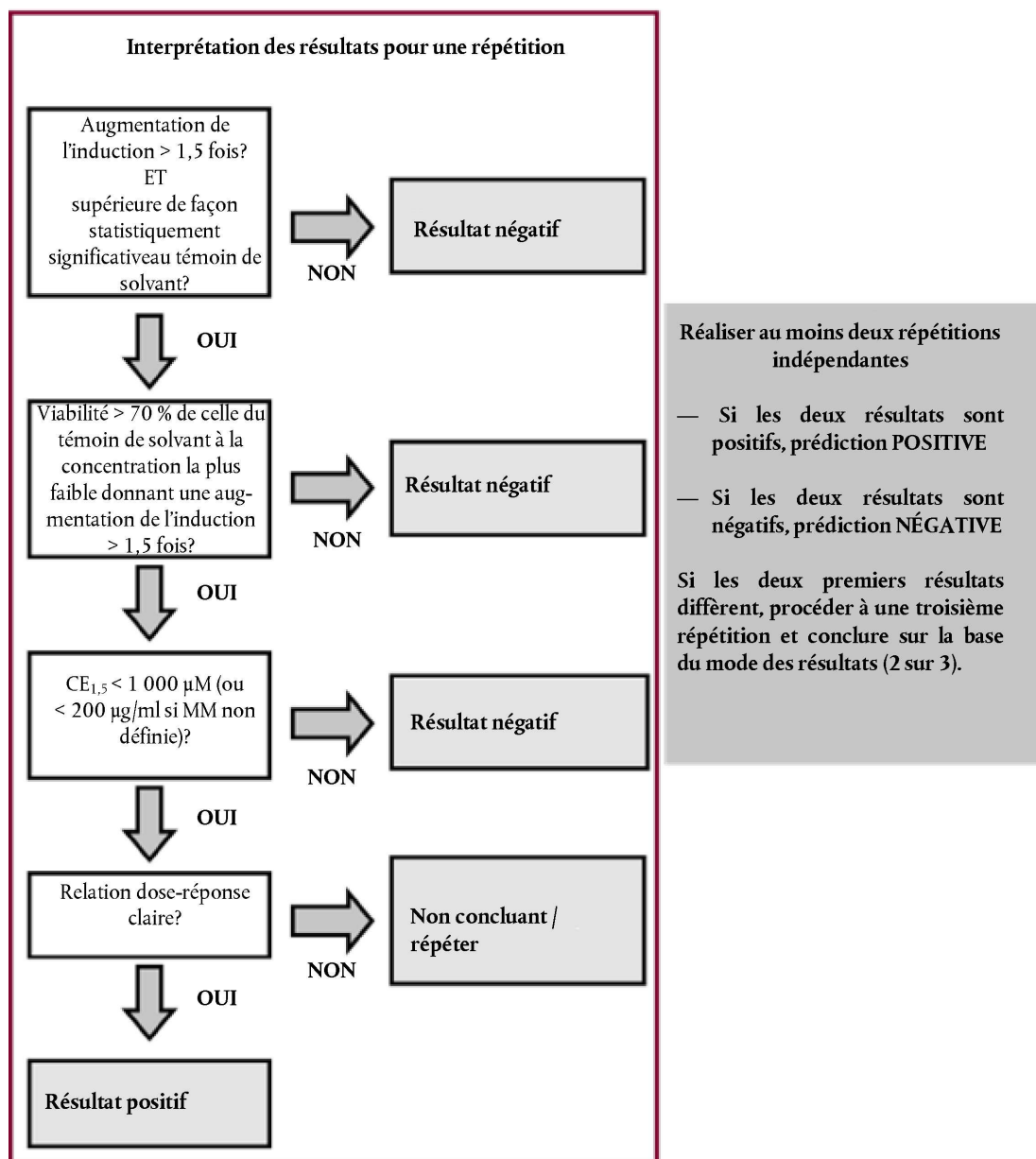
Une prédiction KeratinoSens™ est considérée comme positive si les 4 conditions suivantes sont remplies lors de 2 répétitions sur 2 ou sur 3; dans le cas contraire, la prédiction KeratinoSens™ est considérée comme négative (figure 1):

1. I_{max} est supérieur à ($>$) 1,5 fois et supérieur de façon statistiquement significative à la valeur obtenue pour le témoin (négatif) de solvant (tel qu'il a été déterminé par un test t de Student bilatéral non-apparié);
2. la viabilité cellulaire est supérieure à ($>$) 70 % à la concentration la plus faible pour laquelle l'augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase est supérieure à 1,5 fois (c'est-à-dire à la concentration déterminant $CE_{1,5}$);
3. la valeur de $CE_{1,5}$ est inférieure à ($<$) 1 000 μM (ou < 200 $\mu\text{g/ml}$ pour les produits chimiques d'essai n'ayant pas de masse moléculaire définie);
4. on observe globalement une relation dose-réponse claire pour l'induction de la luciférase (ou une réponse biphasique, comme indiqué au paragraphe 33).

Si, lors d'une répétition donnée, les trois premières conditions sont remplies mais qu'il n'y a pas de relation dose-réponse clairement observable pour l'induction de la luciférase, le résultat de cette répétition doit être considéré comme non concluant et des tests supplémentaires peuvent être requis (figure 1). En outre, un résultat négatif obtenu avec des concentrations $< 1 000$ μM (ou < 200 $\mu\text{g/ml}$ pour les produits chimiques dont le poids moléculaire n'est pas défini) sera également considéré comme non concluant (voir le paragraphe 11).

Figure 1

Modèle prédictif utilisé dans l'essai KeratinoSens™. Une prédiction KeratinoSens™ doit être envisagée dans le cadre d'une démarche IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 11.



Dans de rares cas, les produits chimiques d'essai qui induisent une activité de la luciférase à des niveaux très proches des concentrations cytotoxiques peuvent être positifs à des concentrations non cytotoxiques (c.à.d. $EC_{1,5}$ déterminant la concentration en-dessous (<) de l' IC_{30}), et dans d'autres répétitions, uniquement à des concentrations cytotoxiques (c.à.d. $EC_{1,5}$ déterminant la concentration en-dessus (>) de l' IC_{30}). Ces produits seront re-testés en procédant à une analyse dose-réponse plus serrée, avec un facteur de dilution plus bas (par exemple, 1,33 ou $\sqrt{2}$ (=1,41) fois entre puits), afin de déterminer si l'induction s'est produite à des niveaux cytotoxiques ou non (9).

Rapport d'essai

Le rapport d'essai devra comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

- Substance mono-constituant
 - Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

- Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
 - Concentration(s) testée(s);
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:
- Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
 - Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
 - Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
 - Concentration(s) testée(s);
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins

- Témoin positif
- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
 - Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
 - Concentration(s) testée(s);
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
 - Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Témoin (véhicule) négatif
- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
 - Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs / véhicules autres que ceux mentionnés dans la méthode d'essai sont utilisés, et selon les données disponibles;
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
 - Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;
- Description de la méthode d'essai utilisée;
- Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);
- Nombre de repiquages et niveau de confluence des cellules utilisées pour l'essai;
- Méthode de comptage des cellules utilisée pour l'ensemencement avant l'essai, et mesures prises pour assurer une répartition quantitative homogène des cellules (cf. paragraphe 18);
- Luminomètre utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, substrat de luciférase utilisé, et démonstration de la qualité des mesures de luminescence, d'après le test décrit à l'appendice 3;
- Procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (p. ex. au moyen des substances d'épreuve de compétence) ou pour démontrer la reproductibilité de cette application dans le temps.

Mode opératoire

- Nombre de répétitions et de réplicats utilisés;
- Concentration de produit chimique d'essai, procédure d'application et moment d'exposition (si différent du moment recommandé)
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;
- Description des critères d'acceptabilité de l'étude appliqués;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

- Tableau des valeurs obtenues pour I_{\max} , $CE_{1,5}$ (c.à.d. IC_{50} et IC_{30}) et la viabilité, pour le produit chimique d'essai et pour le témoin positif dans chaque répétition, ainsi que des valeurs moyennes (I_{\max} : moyenne arithmétique; $CE_{1,5}$ et viabilité: moyenne géométrique) et des écarts-types calculés en utilisant les données de chaque répétition, et indication du classement du produit chimique d'essai selon le modèle prédictif;
- Coefficient de variation des données de luminescence obtenu dans chaque expérience pour le témoin négatif;
- Graphique représentant les courbes dose-réponse pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité;
- Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- Discussion des résultats obtenus par l'essai KeratinoSens™;
- Examen des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (ONU) (2013). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), 5^e édition révisée, Nations Unies New York et Genève, 2013. Disponible à l'adresse suivante: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 168. OCDE, Paris

- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorra P., Munn S., Pfuhrer S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- (4) Chapitre B.42 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques.
- (5) Chapitre B.6 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée.
- (6) Chapitre B.50 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: DA.
- (7) Chapitre B.51 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Disponible à l'adresse suivante: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Disponible à l'adresse suivante: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.

- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
 - (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
 - (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1969.
 - (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
 - (23) OCDE (2012). Essai de transactivation faisant appel au récepteur des œstrogènes BG1Luc pour identifier les agonistes ou antagonistes des récepteurs des œstrogènes. Ligne directrice 457 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
 - (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
 - (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
 - (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
 - (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
 - (28) OCDE (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Série sur les essais et les évaluations n° 213. OCDE, Paris.
 - (29) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 34. OCDE, Paris, France.
 - (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

AOP (Adverse Outcome Pathway): séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (2).

ARE: L'élément de réponse antioxydant (aussi appelé EpRE, élément de réponse électrophile) est un élément de réponse présent dans la région promotrice amont de nombreux gènes cytoprotecteurs et gènes de phase II. Lorsqu'il est activé par le facteur Nrf2, il médie l'induction transcriptionnelle de ces gènes.

Coefficient de variation: la mesure de la variabilité calculée pour un groupe de données issues de réplicats en divisant la déviation standard par la moyenne. Cette mesure peut être multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage.

Danger: Propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

EC_{1,5}: Concentration, établie par interpolation, à laquelle l'induction de luciférase est multipliée par 1.5.

Fiabilité: Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (29).

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

IC₃₀: Concentration pour laquelle la viabilité cellulaire, établie par le test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de thiazolyl tétrazolium bleu; n°CAS 298-93-1), est réduite de 30 %.

IC₅₀: Concentration pour laquelle la viabilité cellulaire, établie par le test au MTT, est réduite de 50 %.

I_{max}: Facteur d'induction maximale de l'activité de la luciférase, à quelque concentration du produit chimique d'essai, comparé au témoin (négatif) de solvant.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, est une protéine détectrice pouvant réguler l'activité du facteur Nrf2. En conditions non induites, la protéine détectrice Keap1 cible le facteur de transcription Nrf2 et provoque son ubiquitination et sa dégradation protéolytique dans le protéasome. En cas de modification covalente des résidus cystéine réactifs de Keap1 par des molécules de petite taille, Nrf2 peut se dissocier de Keap1 (8) (10) (11).

Mélange: Mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles (1).

Méthode d'essai valide: Méthode d'essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Une méthode d'essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (29).

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Facteur de transcription intervenant dans la voie de réponse antioxydante. Lorsque Nrf2 n'est pas ubiquitiné, il se développe dans le cytoplasme et se transloque dans le noyau, où il se combine à l'ARE dans la région promotrice amont de nombreux gènes cytoprotecteurs, dont il initie la transcription (8) (10) (11).

Pertinence: Décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (29).

Précision: Étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (29).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: Le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé.

Reproductibilité: Accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (29).

Sensibilité: Proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (29).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: Proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (29).

Substance: Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (1).

Substance mono-constituant: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multi-constituants est le résultat d'une réaction chimique.

Témoin de solvant/véhicule: Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Appendice 2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in vitro*: méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant les prédictions attendues par la méthode KeratinoSens™ pour les 10 substances d'épreuve de compétence recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de CE_{1,5} et CI₅₀ se situant dans les domaines de référence respectifs de ces deux grandeurs pour au moins 8 des 10 substances d'épreuve de compétence. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la qualité élevée des données de référence *in vivo* disponibles et des données *in vitro* obtenues par l'essai KeratinoSens™.

Tableau 1

Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à l'essai KeratinoSens™

Substances d'épreuve de compétence	N°CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Prédiction KeratinoSens™ ⁽²⁾	CE _{1,5} (µM) Domaine de référence ⁽³⁾	CI ₅₀ (µM) Domaine de référence ⁽³⁾
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Alcool cinnamyl-lique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	Positive	25 – 175	> 1 000
Diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	5 – 125	> 500
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	Positive	25 – 250	> 500
Methyldibromoglutaronitrile	35691-65-7	Solide	Sensibilisant (fort)	Positive	< 20	20 – 100
4-Méthylamino-phenol sulfate	55-55-0	Solide	Sensibilisant (fort)	Positive	< 12.5	20 – 200
2,4-Dinitro-chlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	< 12.5	5 – 20

⁽¹⁾ La prédiction des dangers *in vivo* (et la puissance) est fondée sur les données ELGL (13). La puissance *in vivo* est déterminé au moyen des critères proposé par ECETOC (24).

⁽²⁾ Une prédiction KeratinoSens™ doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 11 de la présente méthode d'essai.

⁽³⁾ D'après les données historiques observées (12).

Appendice 3

CONTRÔLE QUALITÉ DES MESURES DE LUMINESCENCE

Expérience préliminaire visant à garantir des mesures de luminescence optimales lors de l'essai Keratino-Sens™

Les trois paramètres suivants sont essentiels pour garantir l'obtention de résultats fiables au luminomètre:

- sensibilité suffisante assurant un niveau de fond stable dans les puits témoins;
- absence de gradient sur la plaque dû à des temps de lecture trop longs; et
- absence de contamination lumineuse des puits à forte activité vers les puits adjacents.

Avant de procéder à l'essai, il est recommandé de vérifier la qualité des mesures de luminescence en testant une plaque témoin organisée comme indiqué ci-après (analyse en triplicat).

Organisation de la plaque pour l'essai préliminaire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	DMAEG 0,98	DMAEG 1,95	DMAEG 3,9	DMAEG 7,8	DMAEG 15,6	DMAEG 31,25	DMAEG 62,5	DMAEG 125	DMAEG 250	DMAEG 500	DMAEG 1000	DMAEG 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	AC 4	AC 8	AC 16	AC 32	AC 64	Vide

DMAEG = diméthacrylate d'éthylène glycol (CAS No: 97-90-5), produit chimique provoquant une forte induction

AC = aldéhyde cinnamique, témoin positif (CAS No: 104-55-2)

L'analyse de contrôle qualité doit établir:

- une relation dose-réponse claire à la ligne D, avec un $I_{\max} > 20$ fois le niveau de fond (dans la plupart des cas, I_{\max} atteint des valeurs comprises entre 100 et 300);

- l'absence de relation dose-réponse aux lignes C et E (pas de valeur d'induction supérieure à 1.5 (idéalement 1.3) en raison d'une possible contamination lumineuse, particulièrement à proximité des puits fortement actifs de la ligne DMAEG);
 - l'absence de différence statistiquement significative entre les lignes A, B, C, E, F et G (absence de gradient sur la plaque); et
 - une variabilité dans les lignes A, B, C, E, F et G et les puits DMSO de la ligne H qui est inférieure à 20 % (niveau de fond stable).
-

B.61 Méthode d'essai de diffusion de fluorescéine pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 460 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode d'essai de diffusion de fluorescéine (DF) est une méthode d'essai *in vitro* qui, dans certaines circonstances et assortie de restrictions spécifiques, peut être utilisée pour classer les produits chimiques (substances et mélanges) comme corrosifs et fortement irritants pour l'œil, au sens du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (catégorie 1), du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ⁽¹⁾ (catégorie 1), et de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) (catégorie I) (1) (2). Aux fins de la présente méthode d'essai, les substances fortement irritantes pour l'œil sont définies comme des produits chimiques provoquant des lésions des tissus oculaires après application sur l'œil, lésions qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou qui entraînent une dégradation sévère de la vue, tandis que les substances corrosives pour l'œil occasionnent des lésions irréversibles des tissus oculaires. Ces substances sont classées dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

Bien que la méthode d'essai de DF n'ait pas été validée comme méthode substitutive complète à l'essai oculaire *in vivo* sur le lapin, elle est recommandée comme élément d'une stratégie d'essais à plusieurs niveaux à des fins de classification et d'étiquetage réglementaires. Le recours à la DF est en effet recommandé en phase initiale d'une approche «top-down» (descendante) pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil, en particulier pour certains types de produits chimiques (substances et mélanges hydrosolubles) (3) (4).

Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer le test *in vivo* [méthode d'essai B.5 (5)] pour établir le degré d'irritation provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test *in vivo* (4). L'approche «top-down» (45) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant.

Suivant le modèle prédictif détaillé au paragraphe 35, la méthode d'essai de DF permet, sans essai complémentaire, de classer les produits chimiques comme corrosifs ou fortement irritants pour l'œil dans un domaine d'applicabilité limité (catégorie 1 du SGH; catégorie 1 du CLP; catégorie I de l'EPA). On suppose que la méthode s'applique également aux mélanges bien qu'aucun mélange n'ait été utilisé pour la validation. La méthode d'essai de DF peut donc servir à identifier les substances chimiques irritantes/corrosives pour l'œil en suivant la stratégie d'essais séquentiels de la méthode d'essai B.5 (6). Toutefois, si un produit chimique n'est pas identifié comme corrosif ou fortement irritant pour l'œil à l'issue de l'essai de DF, il convient de le soumettre à une ou plusieurs autres méthodes d'essai (*in vitro* et/ou *in vivo*) capables d'identifier précisément i) les substances qui sont des faux négatifs pour les essais de DF *in vitro* visant à repérer les effets corrosifs/fortement irritants sur l'œil (catégorie 1 du SGH; catégorie 1 du CLP; catégorie I de l'EPA); ii) les substances non classées en ce qui concerne la corrosion/l'irritation oculaire (pas de catégorie dans le SGH; pas de catégorie dans le CLP; catégorie IV de l'EPA); et/ou iii) les substances modérément à légèrement irritantes pour l'œil (catégories 2A et 2B du SGH; catégorie 2 du CLP; catégories II et III de l'EPA).

L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer les éventuels effets corrosifs ou fortement irritants pour l'œil d'un produit chimique au regard de sa capacité d'induire des lésions sur une monocouche épithéliale confluyente imperméable. L'intégrité de la perméabilité transépithéliale constitue une fonction primordiale d'un épithélium tel que celui présent dans la conjonctive et la cornée. La perméabilité transépithéliale est contrôlée par diverses jonctions serrées. Une corrélation a été démontrée entre l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium cornéen *in vivo* et la sévérité de l'inflammation et des lésions de la surface de l'œil observées dans le développement d'une irritation oculaire.

La méthode d'essai de DF permet de mesurer les effets toxiques induits après un court temps d'exposition au produit chimique d'essai en déterminant l'augmentation de la perméabilité à la fluorescéine-sodium à travers une monocouche épithéliale de cellules rénales de chien Madin-Darby (MDCK) cultivées sur des inserts perméables. La quantité de fluorescéine qui se diffuse est proportionnelle aux lésions provoquées par le produit chimique sur les jonctions serrées, les desmosomes et les cellules membranaires, et permet ainsi d'estimer sa toxicité potentielle pour l'œil. L'appendice 1 contient un diagramme représentant les cellules MDCK cultivées sur la membrane d'un insert pour la méthode d'essai de DF.

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

La méthode d'essai s'inspire du protocole INVITTOX n° 71 (6) qui a fait l'objet d'une évaluation dans le cadre d'une étude de validation internationale par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM), en collaboration avec le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis et avec le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM).

La méthode d'essai de DF n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques qui devraient être classés comme légèrement à modérément irritants, ou ceux qui ne devraient pas être classés comme irritants pour l'œil (substances et mélanges) (qui relèvent des catégories 2A/2B ou d'aucune catégorie dans le SGH; de la catégorie 2 ou d'aucune catégorie dans le CLP; des catégories II, III et IV de l'EPA), comme l'a démontré l'étude de validation (3) (7).

La méthode d'essai ne s'applique qu'aux produits chimiques (substances et mélanges) hydrosolubles. Elle permet généralement de prévoir avec précision l'effet potentiel fortement irritant pour l'œil de produits chimiques qui sont hydrosolubles et/ou dont l'effet toxique n'est pas modifié par la dilution (7). Dans les conditions expérimentales, un produit chimique sera considéré comme hydrosoluble s'il est soluble dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) stérile avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol, à une concentration supérieure ou égale à 250 mg/ml (soit une dose au-dessus de la valeur seuil fixée à 100 mg/ml). Néanmoins, si la substance d'essai est soluble à une concentration inférieure à 100 mg/ml, mais induit déjà une DF de 20 % à cette concentration (donc si $DF_{20} < 100$ mg/ml), elle peut quand même être classée dans la catégorie 1 du SGH ou dans la catégorie I de l'EPA.

Les acides et bases forts, les fixateurs cellulaires et les substances très volatiles sont hors des limites d'application mises en évidence pour cette méthode d'essai. Ces produits chimiques participent en effet à des mécanismes qui ne sont pas mesurés par la méthode de DF, par exemple coagulation extensive, saponification ou réactions chimiques spécifiques. Les résultats obtenus avec les produits chimiques d'essai colorés et visqueux révèlent d'autres limites de la capacité de prévision de cette méthode (7). En effet, ces deux types de substances sont difficiles à éliminer de la monocouche après le court temps d'exposition, et il est suggéré que la qualité de prévision de la méthode d'essai pourrait être améliorée en augmentant le nombre d'étapes de lavage mises en œuvre. Par ailleurs, les produits chimiques solides en suspension dans un liquide ont tendance à précipiter, si bien qu'il peut être difficile de déterminer la concentration finale à laquelle sont exposées les cellules. Si l'on exclut de la base de données les produits chimiques relevant de ces classes chimiques et physiques, la précision de la méthode de DF au regard des systèmes de classification de l'UE, de l'EPA et de l'ONU se trouve considérablement améliorée (7).

Dans l'optique de la présente méthode d'essai (qui vise exclusivement à identifier les substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), les taux de faux négatifs (voir paragraphe 13) ne sont pas préoccupants car les produits chimiques concernés feront l'objet d'essais chez le lapin ou d'autres essais *in vitro* dûment validés, conformément aux exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve (5) (voir également les paragraphes 3 et 4).

La méthode d'essai de DF révèle d'autres limites à l'examen des taux de faux négatifs et faux positifs. Quand l'essai de DF est mis en œuvre en phase initiale d'une approche «top-down» pour identifier les substances et mélanges hydrosolubles corrosifs/fortement irritants pour l'œil (catégorie 1 du SGH; catégorie 1 du CLP; catégorie I de l'EPA), le taux de faux positifs est situé entre 7 % (7/103; SGH et CLP) et 9 % (9/99; EPA) et celui de faux négatifs entre 54 % (15/28; EPA) et 56 % (27/48; SGH et CLP), par rapport aux résultats obtenus *in vivo*. Les groupes de produits chimiques induisant des faux positifs et/ou des faux négatifs avec la méthode d'essai de DF ne sont pas définis dans le présent document.

Certaines limites techniques sont propres à la culture de cellules MDCK. Les jonctions serrées qui bloquent le passage du colorant (fluorescéine-sodium) à travers la monocouche baissent en qualité avec l'augmentation du nombre de repiquages des cultures. Or, la formation incomplète des jonctions serrées débouche sur une hausse de la diffusion de fluorescéine dans le témoin non traité. Il importe donc de définir un niveau de diffusion maximal admissible dans les témoins non traités (voir paragraphe 38: diffusion de 0 %). Comme dans tous les essais *in vitro*, les cellules employées risquent de se transformer au fil du temps, c'est pourquoi il est crucial de préciser la fourchette du nombre de passages des essais.

Le domaine d'applicabilité actuel pourrait être étendu dans certains cas, mais seulement après analyse d'un ensemble élargi de données sur les produits chimiques testés, données obtenues de préférence lors d'essais (4). La présente méthode d'essai sera mise à jour en conséquence, après l'examen de nouvelles informations et données.

Tout laboratoire qui fait appel au présent essai pour la première fois doit recourir aux produits chimiques d'épreuve de compétence indiqués à l'appendice 3. Les laboratoires peuvent utiliser ces substances pour apporter la preuve de leur compétence technique au regard de la mise en œuvre de la méthode d'essai de DF avant de soumettre les résultats des essais de DF à des fins de classification réglementaire dans une catégorie de danger.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai de DF est un essai *in vitro* fondé sur des paramètres de cytotoxicité et de fonctionnement cellulaire, réalisé sur une monocouche confluente de cellules épithéliales tubulaires MDCK CB997 cultivées sur des inserts semi-perméables et qui modélisent l'état non proliférant de l'épithélium cornéen *in vivo*. La lignée cellulaire MDCK est bien établie et forme des jonctions serrées et des desmosomes similaires à ceux que l'on observe sur la face apicale des épithéliums conjonctif et cornéen. *In vivo*, les jonctions serrées et les desmosomes empêchent les solutés et les substances exogènes de pénétrer l'épithélium cornéen. La perte d'imperméabilité transépithéliale, qui résulte de lésions des jonctions serrées et des desmosomes, est l'un des effets précoces de l'irritation oculaire d'origine chimique.

Le produit chimique d'essai est appliqué sur la couche confluente de cellules cultivées sur la face apicale de l'insert. Un temps d'exposition réduit, de 1 min, est généralement appliqué pour refléter la vitesse de clairance normalement associée aux expositions humaines. L'un des avantages d'une courte durée d'exposition est que les substances et mélanges aqueux peuvent être évalués purs, s'il est possible de les éliminer facilement à l'issue du temps d'exposition. Cette possibilité permet d'effectuer des comparaisons plus directes avec les effets chimiques chez l'être humain. Le produit chimique d'essai est ensuite éliminé et la fluorescéine-sodium, un colorant non toxique et très fluorescent, est ajoutée sur la face apicale de la monocouche pendant 30 minutes. Les lésions induites par le produit chimique d'essai sur les jonctions serrées sont déterminées par la quantité de fluorescéine qui diffuse à travers la couche cellulaire pendant une durée définie.

La quantité de colorant (fluorescéine-sodium) qui a traversé la monocouche puis la membrane de l'insert et se retrouve dans un volume donné de solution du puits (où diffuse le colorant) est déterminée par mesure spectrofluorimétrique de la concentration de fluorescéine dans le puits. L'ampleur de la diffusion de fluorescéine (DF) est calculée par rapport aux intensités de fluorescence (IF) relevées pour deux témoins: un témoin à blanc et un témoin de la diffusion maximale. Le pourcentage de diffusion, et donc l'ampleur des lésions des jonctions serrées, est exprimé, par rapport à ces deux témoins, pour chacune des concentrations du produit chimique d'essai. On calcule alors la DF₂₀ (c'est-à-dire la concentration provoquant une DF égale à 20 % de la valeur relevée pour la monocouche confluente non exposée et les inserts sans cellules). La valeur de la DF₂₀ (mg/ml) est alors utilisée dans le modèle de prévision pour identifier les produits chimiques corrosifs et fortement irritants pour l'œil (voir paragraphe 35).

La capacité de récupération constitue un aspect important du profil toxicologique d'un produit chimique d'essai, également évaluée dans l'essai d'irritation oculaire *in vivo*. Des analyses préliminaires indiquent que les données sur la récupération (jusqu'à 72 h après l'exposition chimique) sont susceptibles d'améliorer la capacité de prévision du protocole INVITTOX 71, mais d'autres évaluations s'imposent et nécessitent des données supplémentaires, obtenues de préférence lors d'essais complémentaires (6). La présente méthode d'essai sera mise à jour en conséquence, après l'examen de nouvelles informations et données.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de la monocouche cellulaire

La monocouche de cellules MDCK CB997 est préparée avec des cellules sub-confluentes cultivées en fioles dans le milieu de Eagle modifié de Dulbecco/mélange nutritif F12 (concentré x 1 avec L-glutamine, HEPES à 15 mM, calcium à 1,0 — 1,8 mM, et 10 % de SVF/SBF désactivé à chaud). Il importe que tous les milieux et solutions employés au cours de l'essai de DF contiennent du calcium à une concentration située entre 1,0 mM (111 mg/l) et 1,8 mM (200 mg/l), pour garantir la formation et l'intégrité des jonctions serrées. La fourchette du nombre de repiquages de cellules doit faire l'objet d'un témoin pour assurer une formation régulière et reproductible des jonctions serrées. On privilégiera les cellules obtenues après 3 à 30 repiquages à partir de la décongélation, car les cultures situées dans cette plage présentent une fonctionnalité similaire, ce qui contribue à la reproductibilité des résultats de l'essai

En amont de l'essai de DF, les cellules sont détachées de la fiole par trypsinisation et centrifugées, puis la quantité nécessaire de cellules est repiquée dans les inserts placés dans des plaques 24 puits (voir appendice 1). Pour ce repiquage, on utilisera des inserts de 12 mm de diamètre équipés d'une membrane en esters celluloseux mixtes de 80 à 150 µm d'épaisseur et percée de pores de 0.45 µm. L'étude de validation a été réalisée avec des inserts Millicell-HA 12 mm. Les propriétés de l'insert et du type de membrane sont importantes dans la mesure où elles peuvent modifier la croissance cellulaire et la formation de liaisons chimiques. Certains types de produits chimiques peuvent en effet se lier à la membrane de l'insert Millicell-HA, ce qui peut jouer sur l'interprétation des résultats. Il convient d'utiliser les produits chimiques d'épreuve de compétence (voir appendice 3) pour démontrer l'équivalence d'autres membranes, le cas échéant.

La formation de liaisons chimiques avec la membrane de l'insert est plus courante avec les composés cationiques, comme le chlorure de benzalkonium, qui sont attirés par la membrane chargée (7). Ces liaisons chimiques sont susceptibles de prolonger le temps d'exposition au produit chimique étudié, et d'entraîner ainsi une surestimation de sa toxicité potentielle; elles peuvent aussi limiter physiquement la diffusion de fluorescéine à travers l'insert, en liant le colorant au composé cationique lui-même lié à la membrane, ce qui donne lieu à une sous-estimation de la toxicité potentielle du produit chimique d'essai. On peut évaluer ce phénomène directement en exposant la membrane seule à la concentration maximale du produit chimique testé, puis en ajoutant le colorant fluorescéine-sodium à la concentration normale et pendant le temps d'exposition standard (pas de témoins des cellules). Si la fluorescéine se lie à la membrane de l'insert, celle-ci paraît jaunie une fois que le produit chimique d'essai a été éliminé par lavage. Il est donc essentiel de connaître les affinités de liaison du produit chimique d'essai afin de pouvoir interpréter son effet sur les cellules.

Le repiquage des cellules sur les inserts doit permettre d'obtenir une monocouche confluite au moment de l'exposition chimique. On ajoute 1.6×10^5 cellules par insert (400 µl de suspension cellulaire avec une densité de 4×10^5 cellules/ml). Dans ces conditions, une monocouche confluite apparaît généralement après 96 heures de culture. Il convient d'examiner visuellement les inserts avant le repiquage, pour s'assurer que les lésions éventuellement consignées à l'occasion de la vérification visuelle décrite au paragraphe 30 découlent de la manipulation.

Les cultures de cellules MDCK sont maintenues dans des incubateurs en atmosphère humidifiée, à 5 ± 1 % de CO₂ et 37 ± 1 °C. Les cellules sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmatique ou fongique.

Application des produits chimiques d'essai et témoins

Une nouvelle solution-mère du produit chimique à tester doit être préparée pour chaque série d'essai et utilisée dans les 30 minutes qui suivent sa préparation. Les produits chimiques d'essai sont préparés dans le HBSS avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol, pour éviter les liaisons avec les protéines sériques. La solubilité du produit chimique à 250 mg/ml est évaluée avant l'essai. Si, à cette concentration, il forme une suspension ou une émulsion stable (c'est-à-dire qui reste uniforme et ne décante pas ou ne se sépare pas en plusieurs phases) pendant 30 minutes, on peut maintenir le choix du HBSS comme solvant. Néanmoins, si le produit chimique s'avère insoluble dans le HBSS à cette concentration, on envisagera de recourir à d'autres méthodes que l'essai de DF. La prudence est de mise concernant l'utilisation d'une huile minérale légère comme solvant, dans les cas où le produit chimique se révèle insoluble dans le HBSS, car les données accessibles sont insuffisantes pour conclure sur la performance de l'essai de DF dans ces conditions.

Tous les produits chimiques à évaluer sont préparés à partir de la solution-mère, dans du HBSS stérile avec calcium (à une concentration de 1.0 — 1.8 mM) et sans rouge phénol, en cinq dilutions dont les concentrations massiques sont fixées: 1, 25, 100 et 250 mg/ml ainsi qu'une solution pure ou saturée. En cas d'évaluation d'un composé solide, on inclura une très forte concentration de 750 mg/ml. Cette concentration de la substance d'essai doit parfois être appliquée sur les cellules à l'aide d'une pipette à déplacement positif. Si des effets toxiques apparaissent entre 25 et 100 mg/ml, il convient d'analyser également les concentrations suivantes à deux reprises: 1, 25, 50, 75 et 100 mg/ml. La DF₂₀ sera déduite de ces concentrations, à condition que les critères d'adaptation soient satisfaits.

Avant d'appliquer les substances d'essai sur les monocouches de cellules confluentes, le milieu de culture cellulaire est retiré et les monocouches sont lavées deux fois avec du HBSS stérile avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol amené à 37 °C. On aura préalablement effectué une vérification visuelle des filtres à la recherche d'éventuelles lésions déjà présentes et qui pourraient être faussement imputées à une incompatibilité potentielle avec le produit chimique d'essai. Pour chaque concentration du produit chimique d'essai et pour les témoins, on met en œuvre au moins trois réplicats par série d'essai. Après 1 min d'exposition à température ambiante, le produit chimique d'essai est soigneusement éliminé par pipetage, la monocouche est lavée deux fois avec du HBSS stérile amené à 37 °C avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol, et la diffusion de fluorescéine est immédiatement quantifiée.

Les témoins concurrents négatifs (TN) et positifs (TP) sont présents dans chaque série d'essai pour démontrer que l'intégrité de la monocouche (TN) et la sensibilité des cellules (TP) sont dans une fourchette admissible, définie d'après les résultats historiques. Le composé recommandé comme TP est le Brij 35 (n°CAS 9002-92-0) à 100 mg/ml. Cette concentration devrait induire environ 30 % de diffusion de fluorescéine (plage admissible: 20 — 40 % de DF, donc de lésions de la couche cellulaire). Le composé recommandé comme TN est le HBSS avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol (témoin à blanc non traité). Un témoin de la diffusion maximale est également inclus dans chaque série d'essai pour permettre de calculer les DF_{20} . La diffusion maximale est déterminée à l'aide d'un insert témoin ne contenant pas de cellules.

Détermination de la perméabilité à la fluorescéine

Immédiatement après avoir retiré les produits chimiques d'essai et témoins, ajouter aux inserts (Millicell-HA, par exemple) 400 µl de solution de fluorescéine-sodium à 0,1 mg/ml (soit 0,01 % en m/v dans du HBSS avec calcium [à 1,0 — 1,8 mM] et sans rouge phénol). Les cultures sont maintenues à température ambiante pendant 30 minutes. À l'issue de l'incubation avec la fluorescéine, les inserts sont délicatement retirés de tous les puits. On effectue une vérification visuelle de chaque filtre, et toute lésion éventuellement causée par la manipulation est consignée.

La quantité de fluorescéine diffusée à travers la monocouche et l'insert est mesurée dans la solution qui reste dans les puits après le retrait des inserts. Ces mesures sont effectuées avec un spectrofluorimètre à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 530 nm, respectivement. Il convient de régler la sensibilité du spectrofluorimètre de façon à obtenir une différence de valeur aussi large que possible entre la DF maximale (insert sans cellules) et la DF minimale (insert contenant la monocouche confluyente traitée avec le TN). En raison des différences entre les spectrofluorimètres employés, il est suggéré de fixer la sensibilité de manière à obtenir une intensité de fluorescence > 4 000 pour le témoin de la diffusion maximale de fluorescéine. La valeur correspondant à la DF maximale ne doit pas dépasser 9 999. L'intensité de fluorescence correspondant à la diffusion maximale doit rester comprise dans la fourchette de fonctionnement linéaire du spectrofluorimètre utilisé.

Interprétation des résultats et modèle de prévision

La quantité de DF est proportionnelle aux lésions induites par le produit chimique d'essai sur les jonctions serrées. Le pourcentage de DF pour chaque concentration du produit chimique évalué est calculé à partir des DF obtenues pour ce produit en fonction des DF correspondant au TN (relevées pour la monocouche confluyente de cellules traitées avec le TN) et au témoin de la diffusion maximale (relevés de la quantité de DF à travers un insert dépourvu de cellules).

Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence de la diffusion maximale = x

Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence pour une diffusion de 0 % (TN) = y

La diffusion de 100 % moyenne est calculée en soustrayant la diffusion de 0 % moyenne de la diffusion maximale moyenne,

soit $x - y = z$

On calcule le pourcentage de diffusion pour chaque dose fixée en soustrayant la diffusion de 0 % de la moyenne des intensités de fluorescence relevées pour les trois réplicats (m), puis en divisant la valeur obtenue par la diffusion de 100 %, soit $\%DF = [(m - y) / z] \times 100 \%$, où:

m = intensité de fluorescence moyenne des trois réplicats de la concentration concernée

%DF = pourcentage de fluorescéine qui se diffuse à travers la couche cellulaire

On applique l'équation suivante pour calculer la concentration de produit chimique induisant une DF de 20 %:

$$DF_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Où:

D = % d'inhibition

A = % de lésions (20 % de diffusion de fluorescéine)

B = % de diffusion de fluorescéine < A

C = % de diffusion de fluorescéine > A

M_C = concentration (mg/ml) de C

M_B = concentration (mg/ml) de B

La valeur seuil de la DF₂₀ permettant de prévoir que les produits chimiques sont corrosifs/fortement irritants pour l'œil est indiquée ci-dessous:

DF ₂₀ (mg/ml)	C&E du SGH (ONU)	C&E du CLP (UE)	C&E de l'EPA (États-Unis)
≤ 100	Catégorie 1	Catégorie 1	Catégorie I

C&E: système de classification et d'étiquetage

La méthode d'essai de DF est recommandée exclusivement pour l'identification des substances hydrosolubles corrosives ou fortement irritantes pour l'œil (catégorie 1 du SGH, catégorie 1 du CLP, catégorie I de l'EPA) (voir paragraphes 1 et 10).

Pour qu'un produit chimique (substance ou mélange) hydrosoluble (3) (6) (7) soit classé comme provoquant des «lésions oculaires graves» (catégorie 1 du SGH et du CLP) ou comme «corrosif ou fortement irritant pour l'œil» (catégorie I de l'EPA), il faut que le produit chimique d'essai induise une DF₂₀ ≤ 100 mg/ml.

Acceptation des résultats

La valeur moyenne de la diffusion maximale de fluorescéine (x) doit dépasser 4 000 (voir paragraphe 31), la moyenne de la diffusion de 0 % (y) doit être inférieure ou égale à 300, et la moyenne de la diffusion de 100 % (z) doit tomber entre 3 700 et 6 000.

Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif provoque des lésions sur 20 à 40 % de la couche de cellules (déterminées en % de diffusion de fluorescéine).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

Pour chaque série, les données des puits correspondant à chaque réplicat (par exemple les intensités de fluorescence et les pourcentages de DF calculés pour chaque produit chimique d'essai, y compris leur classification) sont présentées sous forme de tableau. Il convient en outre de rapporter les moyennes ± écart-type des mesures correspondant à chaque réplicat pour chaque série d'essais.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produits chimiques d'essai et témoins

- nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus;
- numéro CAS du produit chimique, s'il est connu;
- pureté et composition de la substance ou du mélange (en pourcentage pondéral), dans la mesure où cette information est disponible;
- propriétés physico-chimiques utiles à la conduite de l'étude (par ex. état physique, volatilité, pH, stabilité, hydrosolubilité, classe chimique);
- le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai et témoins avant l'essai, (par ex. chauffage, broyage);
- conditions de stockage;

Justification de la méthode d'essai et du protocole utilisés

- considérations relatives au domaine d'applicabilité et aux limites de la méthode d'essai;

Conditions d'essai

- description du système cellulaire utilisé, y compris le certificat d'authenticité et le statut mycoplasmiqum de la lignée cellulaire;
- détails du mode opératoire utilisé;
- concentration(s) du produit chimique d'essai utilisé(s);
- durée de l'exposition au produit chimique d'essai;
- durée de l'incubation avec la fluorescéine;
- description de toutes les modifications du mode opératoire;
- description des critères d'évaluation utilisés;
- référence aux données historiques du modèle (par ex. témoins négatifs et positifs, substances de référence, le cas échéant);
- informations sur la compétence technique démontrée par le laboratoire;

Résultats

- tableau présentant les données pour chaque produit chimique d'essai, chaque témoin, chaque série d'essai et chaque répliquat (y compris les résultats individuels, les moyennes et les écarts-types);
- classification(s) déduite(s) et modèle de prévision et/ou critères de décision employés;
- description des autres effets observés;

Discussion des résultats

- considérations relatives aux résultats non probants (paragraphe 35: $DF_{20} > 100$ mg/ml) et aux essais supplémentaires;

Conclusions

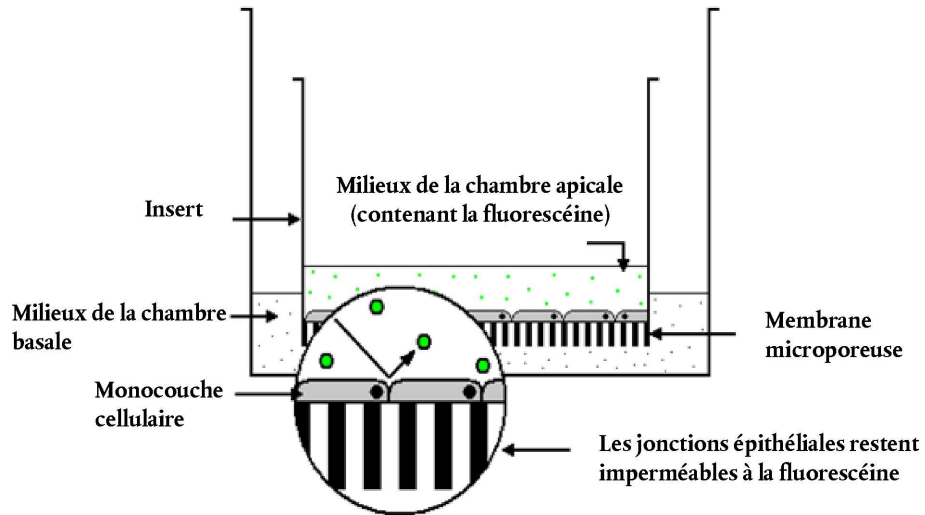
BIBLIOGRAPHIE

- (1) ONU (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, New York & Genève: Publications des Nations Unies. ISBN: 978-92-1-216509-7. Consultable à l'adresse: [http://live.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html]
 - (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: Agence de protection de l'environnement des États-Unis.
 - (3) ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based in vitro assays for eye irritation testing.
 - (4) Scott, L. et autres (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
 - (5) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.
 - (6) ECVAM (1999), protocole INVITTOX 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italie: Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM). Consultable à l'adresse: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
 - (7) ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
 - (8) OCDE (2005), *Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment*, Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 34. OCDE, Paris.
-

Appendice 1

**DIAGRAMME REPRÉSENTANT LES CELLULES MDCK CULTIVÉES SUR LA MEMBRANE D'UN INSERT
POUR LA MÉTHODE D'ESSAI DE DF**

On cultive une couche confluente de cellules MDCK sur la membrane semi-perméable d'un insert. Les inserts sont placés dans les puits de plaques 24 puits.



Graphique tiré de: Wilkinson, P.J. (2006) Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Thèse de doctorat, Université de Nottingham, Royaume-Uni

Appendice 2

DÉFINITIONS

Catégorie 1 de l'EPA: produits chimiques induisant un effet corrosif (destruction irréversible des tissus oculaires) ou des complications cornéennes ou une irritation persistant plus de 21 jours (2).

Catégorie 1 du SGH: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application.

CLP de l'UE [Règlement (CE) n° 1272/2008 de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges]: vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges).

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

DF₂₀: peut être estimée en déterminant la concentration à laquelle le produit chimique d'essai induit 20 % de diffusion de fluorescéine à travers la couche de cellules.

Diffusion de fluorescéine: quantité de fluorescéine qui traverse la couche cellulaire, mesurée par spectrofluorimétrie.

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un autre essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou l'évaluation des risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et substances d'essai possibles.

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire.

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application.

Mélange: dans le contexte du SGH ONU, désigne un mélange ou une solution composé(e) de deux substances ou plus qui n'interagissent pas.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (8).

Non classé: produit chimique qui n'est pas classé comme irritant oculaire au sens des catégories 1, 2A, ou 2B du SGH (ONU); des catégories 1 ou 2 du CLP (UE); ou des catégories I, II et III de l'EPA (États-Unis).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (8).

Poids de la preuve: prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'une substance chimique et d'étayer cette conclusion.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme et celui de «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique corrosif pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires. (b) produit chimique classé comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Produit chimique d'épreuve de compétence: produit chimique de la liste des produits chimiques de référence qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence à mettre en œuvre la méthode d'essai de référence validée, s'il ne l'a encore jamais utilisée.

Produit chimique fortement irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions des tissus oculaires suite à une application sur la face antérieure de l'œil, qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou entraînent une dégradation sévère de la vue; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

Produit chimique irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant une modification réversible de l'œil suite à une application sur la face antérieure de l'œil; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire dans les catégories 2A ou 2B du SGH (ONU), la catégorie 2 du CLP (UE) ou les catégories II ou III de l'EPA (États-Unis).

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (8).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Substance: dans le contexte du SGH de l'ONU, désigne un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition.

Taux de faux négatifs: proportion de tous les produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion de tous les produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec un produit chimique induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Appendice 3

PRODUITS CHIMIQUES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI DE DF

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de corrosivité oculaire des 8 produits chimiques recommandés dans le tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions locales d'irritation/de corrosion oculaire, sur la base des résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin [ligne directrice 405, méthode d'essai B.5 (5)] (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B, ou Non classé du SGH de l'ONU). Toutefois, compte tenu de l'utilité validée de ces essais (pour identifier uniquement les substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), seuls deux résultats expérimentaux obtenus à des fins de classification (substance corrosive/fortement irritante ou substance non corrosive/non sévèrement irritante) permettent de démontrer les compétences des laboratoires. Les autres critères de sélection retenus ont trait à la disponibilité des produits chimiques dans le commerce, à la disponibilité de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et à l'existence de données de bonne qualité obtenues par la méthode d'essai de DF. C'est pourquoi les produits chimiques d'épreuve de compétence choisis sont issus du «Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing» (8), qui a servi à la validation rétrospective de la méthode d'essai de DF.

Tableau 1

Produits chimiques recommandés pour démontrer la compétence technique des laboratoires au regard de l'essai de DF

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique ⁽¹⁾	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classification <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé onium	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
Hydrochlorure de prométhazine	58-33-3	Amine/amidine, hétérocyclique, composé organo-sulfuré	Solide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
Hydroxyde de sodium (10 %)	1310-73-2	Base	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
Laurylsulfate de sodium (15 %)	151-21-3	Acide carboxylique (sel)	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
4-carboxy-benzaldéhyde	619-66-9	Acide carboxylique, aldéhyde	Solide	Catégorie 2(A)	Non corrosif/ faiblement irritant
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2(A)	Non corrosif/ faiblement irritant
2-méthylacétoacétate d'éthyle	609-14-3	Cétone, ester	Liquide	Catégorie 2(B)	Non corrosif/ faiblement irritant
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Aucune catégorie	Non corrosif/ faiblement irritant

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque produit chimique d'essai à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible sur <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ D'après les résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (ligne directrice n° 405 de l'OCDE, méthode d'essai B.5) et en utilisant le SGH (ONU) et le CLP de l'UE.

⁽³⁾ D'après les résultats obtenus avec l'essai de DF [Protocole INVITTOX n° 71(6)].

B.62 Test des comètes *in vivo* en conditions alcalines sur cellules de mammifères

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 489 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines (technique d'électrophorèse de cellules isolées en gel d'agarose), appelé simplement ci-après "test des comètes", est utilisé pour la détection des cassures de brins d'ADN dans des cellules ou noyaux isolés à partir de divers tissus d'animaux, habituellement des rongeurs, qui ont été exposés à un/des produit(s) potentiellement génotoxique(s). Le test des comètes a été examiné et des recommandations ont été publiées par divers groupes d'experts (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). La présente méthode d'essai s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succinctes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

Le test des comètes a pour objet d'identifier les produits chimiques causant des dommages à l'ADN. En conditions alcalines (pH > 13), le test des comètes peut détecter les cassures simple- et double-brin résultant, par exemple, d'interactions directes avec l'ADN, de sites alcali-labiles ou de cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation par excision. Ces cassures peuvent être réparées, leur effet étant alors non persistant, elles peuvent être létales pour la cellule, ou elles peuvent se fixer sous forme de mutation stable se traduisant par une altération viable permanente. Elles peuvent aussi entraîner des dommages chromosomiques du type de ceux qui sont associés à de nombreuses maladies humaines comme le cancer.

Des études de validation formelle du test des comètes *in vivo* sur les rongeurs ont été coordonnées en 2006-2012 par le Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM), en collaboration avec le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM), le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) et le Centre inter-agences pour l'évaluation des méthodes toxicologiques alternatives du NTP (NICEATM) (12). La présente méthode d'essai indique les applications recommandées et les limites du test des comètes; elle est fondée sur le protocole final (12) utilisé dans les essais de validation, et sur d'autres données pertinentes, publiées ou non (données privées des laboratoires).

Les termes-clés sont définis à l'appendice 1. On notera qu'un grand nombre de supports différents peuvent être utilisés pour ce test (lames de microscope, spots de gel, plaques 96 puits, etc.). Pour des raisons pratiques, le terme de «lame» désigne dans ce qui suit l'ensemble de ces supports.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Le test des comètes est une méthode utilisée pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes. Des cellules/noyaux isolés inclus dans un gel d'agarose déposé sur une lame sont lysés sous l'action d'un détergent et de sels à forte concentration. Cette étape de lyse digère les membranes cellulaires et nucléaires et libère des boucles d'ADN enroulé, généralement appelées nucléoïdes ou fragments d'ADN. L'électrophorèse à pH élevé produit des structures ressemblant à des comètes qui, si l'on utilise les colorants fluorescents appropriés, peuvent être observées par microscopie à fluorescence; les fragments d'ADN migrent de la «tête» vers la «queue» de la comète, selon leur taille, et l'intensité de fluorescence de la queue par rapport à l'intensité totale (tête plus queue) reflète l'ampleur des cassures de l'ADN (13) (14) (15).

Le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque génotoxique, dans la mesure où les réponses au test sont dépendantes de l'ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) *in vivo*, ainsi que des processus de réparation de l'ADN. Ces paramètres peuvent varier selon les espèces, les tissus et les types de dommages subis par l'ADN.

Pour satisfaire aux exigences en matière de bien-être animal, en particulier en ce qui concerne la réduction de l'utilisation d'animaux (règle des 3Rs — Réduction, Refinement, Remplacement, à savoir réduction du nombre d'animaux, réduction des souffrances des animaux, remplacement de l'expérimentation animale par d'autres méthodes), ce test peut aussi être intégré à d'autres études toxicologiques, telles que les études de toxicité à doses répétées (10) (16) (17), ou le paramètre étudié peut être combiné à d'autres paramètres de génotoxicité, dans le cas par exemple du test des micronoyaux sur érythrocytes de mammifères *in vivo* (18) (19) (20). Le test des comètes est le plus souvent réalisé sur des rongeurs, bien qu'il ait été appliqué à d'autres espèces, mammifères ou non. L'utilisation d'espèces autres que des rongeurs devra être justifiée au cas par cas du point de vue scientifique et éthique, et il est fortement recommandé de ne réaliser le test des comètes sur des espèces autres que des rongeurs que dans le cadre d'une autre étude de toxicité, et non en tant qu'essai indépendant.

La sélection de la voie d'exposition et du/des tissu(s) à étudier sera fondée sur l'ensemble des connaissances existantes/disponibles concernant les produits chimiques testés, par exemple la voie d'exposition humaine prévue/anticipée, le métabolisme et la distribution, le potentiel d'effets au site de contact, les alertes structurelles, d'autres données de génotoxicité ou de toxicité, ainsi que l'objectif de l'étude. Le potentiel génotoxique des produits chimiques testés peut ainsi être étudié, s'il y a lieu, sur le(s) tissu(s) cible(s) d'un effet cancérogène et/ou d'autres effets toxiques. Le test est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système *in vitro*. Il est opportun de réaliser un test des comètes *in vivo* sur un tissu donné si l'on peut raisonnablement s'attendre à ce que ce tissu soit exposé de façon adéquate.

Les études de validation les plus complètes dont le test ait fait l'objet ont porté sur les tissus somatiques de rats mâles, dans le cadre d'études interlaboratoires internationales du JaCVAM (12) ou dans Rothfuss et al. 2010 (10). Le foie et l'estomac ont été utilisés dans les études de validation internationales du JaCVAM. Le foie, parce que c'est l'organe le plus actif dans le métabolisme des produits chimiques, et que c'est fréquemment un organe cible pour la cancérogénicité. L'estomac, parce que c'est généralement le premier site de contact avec les produits chimiques en cas d'exposition orale, bien que d'autres régions du tractus gastro-intestinal, comme le duodénum et le jéjunum, puissent aussi être envisagées comme sites de contact et soient peut-être plus pertinentes pour l'homme que l'estomac glandulaire des rongeurs. On veillera à ce que ces tissus ne soient pas exposés à des concentrations trop élevées du produit chimique testé (21). La technique est applicable en principe à tout tissu dont il est possible de dériver des suspensions de cellules/noyaux isolés analysables. Les données privées de nombreux laboratoires démontrent qu'elle peut être appliquée avec succès à un grand nombre de tissus différents, et de nombreuses publications montrent son applicabilité à des organes ou tissus autres que le foie et l'estomac, comme le jéjunum (22), les reins (23) (24), la peau (25) (26), ou des cellules provenant de la vessie (27) (28) ou de lavages pulmonaires ou bronchoalvéolaires (dans le cas d'études portant sur des substances inhalées) (29) (30); des tests ont également été réalisés sur plusieurs organes simultanément (31) (32).

S'il peut être intéressant d'étudier les effets génotoxiques sur des cellules germinales, on notera que le test des comètes standard en conditions alcalines tel qu'il est décrit dans la présente méthode d'essai n'est pas considéré comme approprié pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans des cellules germinales matures. Étant donné que, s'agissant des dommages à l'ADN, des niveaux de fond élevés et variables ont été rapportés dans une revue de la littérature portant sur l'utilisation du test des comètes dans les études de génotoxicité sur les cellules germinales (33), des modifications du protocole et des études améliorées de validation et de standardisation sont jugées nécessaires avant que le test des comètes sur cellules germinales matures (cellules spermatiques, par exemple) puisse être inclus dans la présente méthode d'essai. De plus, le régime d'exposition recommandé dans cette méthode d'essai n'est pas optimal et seuls des temps d'exposition ou d'échantillonnage plus longs permettraient une analyse valable des cassures de brins d'ADN dans le sperme mature. Les effets génotoxiques mesurés par le test des comètes sur des cellules testiculaires à différents stades de différenciation ont été décrits dans la littérature (34) (35). Il convient cependant de noter que les gonades contiennent un mélange de cellules somatiques et de cellules germinales. Pour cette raison, des résultats positifs sur l'ensemble des gonades (testicules) ne témoignent pas nécessairement de dommages touchant les cellules germinales; ils indiquent néanmoins que le/les produit(s) chimique(s) testé(s) et/ou ses/leurs métabolites ont atteint les gonades.

Les pontages ne peuvent pas être détectés de façon fiable dans les conditions expérimentales standard du test des comètes. Dans certaines conditions expérimentales modifiées, des pontages ADN-ADN et ADN-protéine, ainsi que d'autres modifications des bases telles que des bases oxydées pourraient être détectées (23) (36) (37) (38) (39). Des études complémentaires seraient nécessaires pour caractériser de façon adéquate les modifications à apporter au protocole. La détection des agents responsables de pontages n'est donc pas l'objectif premier du test décrit ici. Celui-ci n'est pas adapté, même en cas de modifications, pour la détection des substances aneugènes.

Dans l'état actuel des connaissances, le test des comètes *in vivo* présente une série d'autres limites (voir l'appendice 3). Il faut s'attendre à ce que la présente méthode d'essai soit révisée à l'avenir et modifiée s'il y a lieu à la lumière des acquis de l'expérience.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Une description précise de l'administration des doses et de l'échantillonnage est donnée aux paragraphes 36-40. Au(x) moment(s) retenu(s) pour l'échantillonnage, les tissus à étudier sont disséqués et des suspensions de cellules/noyaux isolés sont préparées (une perfusion *in situ* peut être pratiquée si cela est jugé utile, par exemple, pour le foie) et incluses dans un gel d'agarose pour être fixées sur des lames. Les cellules/noyaux sont traités avec un tampon de lyse pour éliminer la membrane cellulaire et/ou nucléaire, et exposés à une base forte (de $\text{pH} \geq 13$, par exemple) pour permettre le déroulement de l'ADN et la libération des boucles et fragments d'ADN déroulés. L'ADN nucléaire dans l'agar est alors soumis à l'électrophorèse. Les molécules d'ADN normales, non fragmentées, restent dans la position où l'ADN nucléaire se trouvait dans l'agar, tandis que tous les fragments d'ADN et boucles d'ADN déroulées migrent vers l'anode. Après l'électrophorèse, l'ADN est visualisé au moyen d'un colorant fluorescent approprié. Les préparations doivent être analysées au microscope et au moyen de systèmes d'analyse d'image automatiques ou semi-automatiques. L'ampleur de la migration de l'ADN au cours de l'électrophorèse et la distance de migration reflètent la quantité et la taille des fragments d'ADN. Différents paramètres peuvent être évalués dans le test des comètes. La proportion d'ADN présent dans la queue, ou intensité de la queue (% tail DNA, ou % tail intensity) a été recommandée pour évaluer les dommages à l'ADN (12) (40) (41) (42). Après analyse d'un nombre suffisant de noyaux, les résultats du test sont interprétés à l'aide de méthodes d'analyse appropriées.

On notera que les modifications apportées à des aspects de la méthodologie tels que la préparation des échantillons, les conditions d'électrophorèse, les paramètres d'analyse visuelle (intensité du colorant, intensité lumineuse de l'ampoule du microscope, par exemple, ou mise en place de filtres sur le microscope et paramètres dynamiques de la caméra) et les conditions ambiantes (éclairage de fond, par exemple) peuvent affecter la migration de l'ADN (43) (44) (45) (46).

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

Chaque laboratoire doit établir ses compétences pour la réalisation du test des comètes, en démontrant son aptitude à obtenir des suspensions de cellules ou de noyaux isolés d'une qualité suffisante pour chaque tissu cible de chaque espèce étudiée. La qualité des préparations sera évaluée avant tout d'après le pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes chez les animaux traités par le véhicule, pour lesquels les valeurs doivent se situer dans une plage basse reproductible. Les données actuelles suggèrent que le pourcentage moyen d'ADN de queue du groupe (d'après la moyenne des médianes — voir le paragraphe 57 pour ces termes) dans le foie de rat devrait, de préférence, ne pas dépasser 6 %, ce qui serait cohérent avec les valeurs des essais de validation du JaCVAM (12) et d'autres données publiées ou privées. On ne dispose pas de données suffisantes à l'heure actuelle pour formuler des recommandations sur les plages optimales ou acceptables concernant d'autres tissus, ce qui n'exclut pas de recourir à d'autres tissus si cela se justifie. Le rapport d'essai devra rendre compte de façon appropriée de la conduite du test des comètes sur ces tissus en faisant référence à la littérature publiée ou à des données privées. Premièrement, un faible pourcentage d'ADN de queue chez les témoins est souhaitable afin de disposer d'une plage dynamique suffisante pour détecter un effet positif. Deuxièmement, chaque laboratoire doit être en mesure de reproduire les réponses attendues pour des mutagènes directs et des promutagènes, pour différents modes d'action, selon les exemples proposés au tableau 1 (paragraphe 29).

Des substances positives peuvent être sélectionnées, par exemple à partir des essais de validation du JaCVAM (12) ou d'autres données publiées (voir paragraphe 9), s'il y a lieu, moyennant une justification et en établissant la preuve de réponses clairement positives dans les tissus d'intérêt. La capacité à détecter les effets faibles de mutagènes connus tels que l'EMS à faibles doses doit également être démontrée, en établissant par exemple des relations dose-réponse avec des nombres de doses et des écarts entre doses appropriés. Les efforts doivent porter dans un premier temps sur l'établissement des compétences pour les tissus les plus couramment utilisés, le foie de rongeurs par exemple, pour lesquels il est possible d'effectuer une comparaison avec les données existantes et les résultats attendus (12). Les données provenant d'autres tissus (estomac/duodénum/jéjunum, sang, etc.) pourraient être collectées simultanément. Le laboratoire devra faire la preuve de sa compétence pour chaque tissu de chaque espèce qu'il prévoit d'étudier, et démontrer qu'une réponse positive acceptable peut être obtenue avec un mutagène connu (l'EMS, par exemple) sur ces tissus.

Il convient de collecter les données sur les témoins négatifs/traités par le véhicule afin de démontrer la reproductibilité des réponses négatives et d'établir que les aspects techniques de l'essai ont été correctement maîtrisés, ou de suggérer la nécessité d'établir de nouvelles plages de données témoins historiques (voir paragraphe 22).

On notera que, si plusieurs tissus peuvent être collectés lors de la nécropsie et traités en vue de l'analyse des comètes, le laboratoire doit être compétent pour recueillir différents tissus sur un même animal, assurant ainsi qu'aucune lésion potentielle de l'ADN ne sera négligée et que l'analyse des comètes ne sera pas compromise. L'intervalle de temps entre le sacrifice des animaux et le prélèvement des tissus en vue de leur traitement peut être critique (voir paragraphe 44).

Le bien-être animal doit être pris en compte lors du développement des compétences pour ce test, et des tissus provenant d'animaux utilisés pour d'autres tests peuvent être utilisés pour se former aux différents aspects du test. De plus, il peut ne pas être nécessaire de conduire une étude complète lors des étapes d'établissement d'une nouvelle méthode d'essai dans un laboratoire, et il est possible de réduire le nombre d'animaux ou le nombre de concentrations étudiées lors de l'acquisition des gestes nécessaires.

Données des témoins historiques

Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire mettra en place une base de données historiques établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés. On trouve dans la littérature (47) des recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base, et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée). Différents tissus et différentes espèces, ainsi que différents véhicules et voies d'administration, peuvent donner des pourcentages d'ADN dans la queue différents pour les témoins négatifs. Il importe donc d'établir les plages des témoins négatifs pour chaque tissu et chaque espèce. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (48)], afin de déterminer la variabilité de leurs données et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie. Le choix des substances chimiques utilisées comme témoins positifs, des gammes de doses et des conditions expérimentales (conditions de l'électrophorèse, par exemple) peut devoir être optimisé pour la détection d'effets faibles (voir paragraphe 17).

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Préparations

Choix des espèces animales

On choisit habituellement des souches communément utilisées en laboratoire de jeunes rongeurs adultes sains (âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables). Le choix de l'espèce de rongeur doit être fondé sur (i) les espèces utilisées dans d'autres études de toxicité (pour qu'il soit possible de corrélérer les données et pour permettre des études intégrées), (ii) les espèces qui ont développé des tumeurs dans une étude de cancérogénicité (lors d'investigations portant sur le mécanisme de cancérogenèse), ou (iii) les espèces dont le métabolisme est le plus proche de celui de l'homme, si elles sont connues. Les rats sont couramment utilisés dans cet essai. Il est toutefois possible de recourir à d'autres espèces si cela est justifié d'un point de vue éthique et scientifique.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

Pour les rongeurs, la température de l'animalerie est idéalement de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 30 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes comprenant généralement un maximum de cinq animaux du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié du point de vue scientifique. Dans la mesure du possible, le fond des cages doit être plein, les fonds grillagés pouvant provoquer de graves blessures (49). Un enrichissement environnemental approprié doit être fourni.

Préparation des animaux

Les animaux sont répartis de manière aléatoire entre les groupes traités et les groupes témoins. Ils sont identifiés individuellement et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement de l'étude, afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. La méthode d'identification individuelle des animaux doit être la moins invasive possible. Les méthodes appropriées sont notamment le baguage, l'étiquetage, la pose d'une puce électronique et l'identification biométrique. L'utilisation d'agrafes au niveau de la patte ou de l'oreille n'est pas scientifiquement justifiée pour ces essais. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas excéder $\pm 20 \%$.

Préparation des doses

Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques testés peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (50) (51).

On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai

Véhicule

Le véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux volumes administrés, ni être suspecté de réagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité eu égard aux animaux d'essai, à la voie d'administration et à l'effet mesuré. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. On notera que certains véhicules (en particulier les véhicules visqueux) peuvent induire une inflammation et augmenter le niveau de fond des cassures de brins d'ADN au site de contact, en particulier en cas d'administration répétée.

Témoins

Témoins positifs

A l'heure actuelle, chaque essai doit normalement inclure un groupe d'au moins trois animaux analysables du même sexe, ou de chaque sexe si les deux sont utilisés (voir paragraphe 32), traités avec un produit chimique utilisé comme témoin positif. Il se peut qu'à l'avenir, le laboratoire puisse démontrer que ses compétences permettent de réduire le nombre de témoins positifs. Si plusieurs moments d'échantillonnage sont prévus (par exemple dans le cas d'un protocole comportant une seule administration), il n'y a lieu d'inclure des témoins positifs que pour l'un des moments d'échantillonnage, mais il importe de veiller à une répartition équilibrée (voir paragraphe 48). Il n'est pas nécessaire d'administrer les substances chimiques utilisées simultanément comme témoins positifs par la même voie que le produit chimique testé, mais il importe d'utiliser la même voie pour mesurer les effets au site de contact. Il doit être établi que les substances utilisées comme témoins positifs induisent des cassures de brins d'ADN dans tous les tissus d'intérêt pour le produit chimique testé, et l'EMS sera sans doute le témoin positif de choix dans la mesure où il a provoqué des cassures de brins d'ADN dans tous les tissus sur lesquels il a été étudié. Les doses des substances chimiques utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets modérés permettant une évaluation éclairée des performances et de la sensibilité du test; elles peuvent être fondées sur les courbes dose-réponse établies par le laboratoire dans le cadre de la démonstration de ses compétences. Le pourcentage d'ADN de queue chez les témoins positifs simultanés doit être en cohérence avec la plage préétablie par le laboratoire pour chaque tissu et moment d'échantillonnage pour l'espèce considérée (voir paragraphe 16). Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles (chez les rongeurs) figurent au tableau 1. Des substances chimiques autres que celles du tableau 1 peuvent être sélectionnées si cela est scientifiquement justifié.

Tableau 1

Exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles

Substances et n° CAS
Éthyl méthanesulfonate (n° CAS 62-50-0), tout tissu
Éthyl nitrosourée (n° CAS 759-73-9), foie et estomac, duodénum ou jéjunum
Méthyl méthanesulfonate (n° CAS 66-27-3), foie, estomac, duodénum ou jéjunum, cellules obtenues par lavage pulmonaire et bronchoalvéolaire, reins, vessie, poumons, testicules et moelle osseuse/sang
N-Méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (n° CAS 70-25-7), estomac, duodénum ou jéjunum
1,2-Diméthylhydrazine 2HCl (n° CAS 306-37-6), foie et intestin
N-méthyl-N-nitrosourée (n° CAS 684-93-5), foie, moelle osseuse, sang, reins, estomac, jéjunum et cerveau.

Témoins négatifs

Un groupe d'animaux témoins négatifs auxquels est administré le véhicule seul, et qui sont traités par ailleurs de la même façon que les groupes exposés, doit être inclus dans chaque essai pour chaque moment d'échantillonnage et chaque tissu. Le pourcentage d'ADN de queue chez les animaux témoins négatifs doit se trouver dans la plage de référence préétablie par le laboratoire pour chaque tissu et chaque moment d'échantillonnage pour cette espèce (voir paragraphe 16). En l'absence de données historiques ou publiées sur les témoins montrant que le véhicule choisi, le nombre d'administrations ou la voie d'administration n'induisent aucun effet délétère ou génotoxique, des études préliminaires seront réalisées avant d'entreprendre l'étude complète, afin d'établir l'acceptabilité des témoins recevant le véhicule.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

Bien qu'il existe peu de données sur des animaux femelles permettant des comparaisons entre sexes dans le cas du test des comètes, les réponses aux autres tests de génotoxicité *in vivo* sont généralement similaires chez les animaux mâles et femelles, et la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité, etc comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'appendice 2.

La taille des groupes au début de l'étude (et lors de l'établissement des compétences) doit permettre de disposer d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés dans chaque groupe (et d'un nombre inférieur dans le groupe témoin positif concomitant — voir paragraphe 29). Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, dans le cas par exemple de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude conduite selon les paramètres établis au paragraphe 33, impliquant trois groupes de traitement et des groupes concurrents de témoins négatifs et de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera entre 25 et 35 animaux.

PROGRAMME DE TRAITEMENT

Les animaux doivent recevoir un traitement quotidien sur une période de 2 jours ou plus (c'est à dire deux traitements ou plus à intervalles de 24 heures environ), et les échantillons doivent être collectés une fois à 2-6 h (ou à T_{max}) après le dernier traitement (12). Des échantillons provenant de programmes de traitement prolongés (dose quotidienne pendant 28 jours, par exemple) sont acceptables. Il a été démontré que le test des comètes pouvait être combiné avec succès au test des micronoyaux sur érythrocytes (10) (19). Cependant, il convient d'accorder une grande attention à la logistique nécessaire pour pratiquer l'échantillonnage des tissus en vue du test des comètes tout en respectant les exigences relatives à celui effectué en vue d'autres types d'évaluations toxicologiques. La collecte 24 h après la dernière dose, classique pour une étude de toxicité générale, n'est pas appropriée dans la plupart des cas (voir le paragraphe 40 sur le moment d'échantillonnage). L'utilisation d'autres programmes de traitement et d'échantillonnage devra être justifiée (voir appendice 3). On pourra par exemple recourir à un traitement unique avec échantillonnages multiples, mais une étude comportant une seule administration nécessitera plus d'animaux, plusieurs moments d'échantillonnage étant requis; cette solution peut toutefois être préférable dans certains cas, par exemple lorsque la substance testée induit une toxicité excessive en cas d'administrations répétées.

Quelle que soit la façon dont l'essai est réalisé, elle est acceptable si le produit chimique testé donne une réponse positive ou, en cas de réponse négative, si une preuve directe ou indirecte de l'exposition du/des tissu(s) cible(s) ou de la toxicité pour ce(s) tissu(s) est apportée, ou si la dose limite est atteinte (voir paragraphe 36).

Pour faciliter l'administration de volumes importants du produit chimique d'essai, celle-ci peut aussi être fractionnée, à raison de deux traitements le même jour à intervalle de deux à trois heures maximum. En pareil cas, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction (voir paragraphe 40).

Niveaux de dose

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables provenant d'autres études pertinentes pour orienter le choix des doses, l'étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale, selon les principes en vigueur pour la conduite des études de détermination des doses. Cette étude devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose induisant de légers effets toxiques liés à la durée de l'étude (avec des signes cliniques clairs tels qu'un comportement ou des réactions anormales, une perte pondérale mineure ou un effet cytotoxique sur un tissu cible, par exemple), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux. Pour un produit chimique non toxique administré sur une période de 14 jours ou plus, la dose (limite) maximale est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration inférieures à 14 jours, la dose (limite) maximale est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour certains types de produits chimiques d'essai (produits pharmaceutiques à usage humain, par exemple) faisant l'objet de réglementations spécifiques, ces limites peuvent être différentes.

Les produits chimiques testés dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évalués au cas par cas.

Pour les versions aiguë et subaiguë du test des comètes, outre la dose maximale (DMT, dose maximale possible, exposition maximale ou dose limite), une série supplémentaire d'au moins deux doses décroissantes présentant des écarts adaptés (facteur inférieur à $\sqrt{10}$, de préférence) doit être sélectionnée pour chaque moment d'échantillonnage afin de mettre en évidence d'éventuelles relations dose-effet. Cependant, les niveaux de dose utilisés doivent aussi couvrir dans la mesure du possible un intervalle compris entre la dose maximale et une dose produisant peu ou pas d'effet toxique. Lorsqu'une toxicité pour un tissu cible est observée à tous les niveaux de dose administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques (voir paragraphes 54-55). Les études visant à établir plus précisément l'allure de la courbe dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires.

Administration des doses

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intratrachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est généralement pas recommandée, car elle n'est pas représentative de l'exposition humaine, et ne sera utilisée qu'en cas de justification spécifique (par exemple pour certaines substances chimiques utilisées comme témoins positifs, à des fins d'investigation, ou pour des médicaments administrés par voie intrapéritonéale). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. L'utilisation de volumes plus importants (si elle est autorisée par la législation relative au bien-être animal) doit être justifiée. Chaque fois que cela est possible, les différents niveaux de dose doivent être obtenus en ajustant la concentration de la formulation administrée pour assurer à tous les niveaux de dose un volume constant rapporté au poids corporel.

Moment d'échantillonnage

Le moment d'échantillonnage est une variable critique car il dépend de la période nécessaire pour que les substances chimiques atteignent leur concentration maximale dans le tissu cible et que des cassures de brins d'ADN soient induites, mais doit se situer avant que ces cassures ne disparaissent, ne soient réparées ou ne provoquent la mort de la cellule. La persistance de certaines des lésions conduisant aux cassures de brins d'ADN détectées par le test des comètes peut être très brève, du moins pour certains produits chimiques testés *in vitro* (52) (53). En conséquence, si des lésions transitoires de ce type sont suspectées, des mesures doivent être prises pour en limiter la disparition, en s'assurant que les tissus sont échantillonnés suffisamment tôt, éventuellement avant les délais par défaut indiqués ci-dessous. Le moment d'échantillonnage optimal peut dépendre du produit chimique ou de la voie d'administration, se traduisant en général par une exposition rapide du tissu lors d'une administration par voie intraveineuse ou par inhalation. Par conséquent, les moments d'échantillonnage seront déterminés en fonction des données cinétiques, quand elles sont disponibles (par exemple, temps (T_{max}) auquel le pic de concentration (C_{max}) dans le plasma ou le tissu est atteint, ou à l'état stationnaire en cas d'administrations multiples). En l'absence de données cinétiques, un compromis approprié pour la mesure de la génotoxicité est l'échantillonnage à 2-6 h du dernier traitement pour deux traitements ou plus, ou à 2-6 h et à 16-26 h d'une administration unique, mais il faut veiller à nécropsier tous les animaux au même moment après la dernière (ou l'unique) dose. Des informations sur la survenue d'effets toxiques dans les organes cibles (lorsqu'elles sont disponibles) peuvent également être utilisées pour sélectionner les moments d'échantillonnage appropriés.

Observations

Des observations cliniques générales relatives à la santé des animaux seront recueillies et consignées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration (54). Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Dans les études de longue durée, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine et à la fin de l'essai. La consommation d'aliments doit être mesurée à chaque renouvellement des aliments et au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai, et ne sont généralement pas utilisés pour le test des comètes.

Collecte des tissus

L'induction de cassures des brins d'ADN (comètes) pouvant être étudiée sur pratiquement tous les tissus, la justification du choix du/des tissu(s) à prélever doit être clairement établie, compte tenu de la raison présidant à la conduite de l'étude et de l'ensemble des données disponibles sur l'ADME, la génotoxicité, la cancérogénicité ou d'autres effets toxiques des produits chimiques étudiés. La voie d'administration (fondée sur la/les voie(s) d'exposition humaine potentielle(s)), la distribution et l'absorption tissulaires prévues, le rôle du métabolisme et le mécanisme d'action possible des produits chimiques étudiés sont des facteurs importants à prendre en considération. Le foie est le tissu qui a été le plus fréquemment étudié et sur lequel les données sont les plus nombreuses.

C'est pourquoi, en l'absence de données préexistantes et d'éléments incitant à choisir un tissu donné, le choix du foie est justifié par le fait que c'est le siège principal du métabolisme des xénobiotiques et qu'il est souvent fortement exposé tant aux produits chimiques initiaux qu'à leur(s) métabolite(s). Dans certains cas, l'examen d'un site de contact direct (l'estomac glandulaire ou le duodénum/jéjunum pour les produits administrés par voie orale, par exemple, ou les poumons pour les produits inhalés) peut être particulièrement indiqué. Des tissus complémentaires ou différents pourront être sélectionnés compte tenu des raisons justifiant la conduite du test, mais il peut être utile d'examiner différents tissus prélevés sur les mêmes animaux, à condition que le laboratoire ait fait la preuve de ses compétences pour ces tissus et de son aptitude à manipuler simultanément différents tissus.

Préparation des prélèvements

Pour les opérations décrites dans les paragraphes suivants (44-49), il importe que toutes les solutions ou suspensions stables soient utilisées avant leur date d'expiration, ou que des solutions ou suspensions fraîches soient préparées si nécessaire. De plus, dans ce qui suit, le temps passé à (i) prélever chaque tissu après la nécropsie, (ii) traiter chaque tissu pour obtenir des suspensions de cellules/noyaux, et (iii) traiter la suspension et préparer les lames, est considéré chaque fois comme une variable critique (voir définitions à l'appendice 1), et des durées acceptables pour chacune de ces étapes doivent avoir été fixées lors de l'établissement de la méthode et de la démonstration des compétences du laboratoire.

Les animaux seront sacrifiés conformément à la législation en vigueur sur le bien-être animal et à la règle des 3R, au(x) moment(s) approprié(s) après la dernière administration du produit chimique d'essai. Le(s) tissu(s) sélectionné(s) est/sont prélevé(s), disséqué(s), une portion est collectée pour le test des comètes et, au même moment, un échantillon de la même partie du tissu est découpé et placé dans une solution de formaldéhyde ou un fixateur approprié pour une éventuelle analyse histopathologique (voir paragraphe 55) selon les méthodes standards (12). Le tissu destiné au test des comètes est placé dans du tampon de broyage, rincé soigneusement au tampon de broyage froid pour éliminer le sang résiduel, et conservé dans du tampon de broyage glacé jusqu'au traitement. Une perfusion *in situ* peut aussi être pratiquée pour le foie ou les reins, par exemple.

Un grand nombre de méthodes d'isolement des cellules/noyaux ont été publiées. Elles incluent le broyage de tissus tels que ceux du foie ou des reins, le raclage de la surface des muqueuses dans le cas du tractus gastro-intestinal, l'homogénéisation et la digestion enzymatique. Les essais de validation du JaCVAM n'ont porté que sur des cellules isolées; pour l'établissement de la méthode et pour pouvoir faire référence aux essais de validation du JaCVAM lors de la démonstration des compétences, on préférera donc les cellules isolées. Cependant, il a été établi que les résultats du test ne diffèrent pas fondamentalement selon que l'on a recours à des cellules ou des noyaux isolés (8). De même, différentes méthodes d'isolement des cellules/noyaux (homogénéisation, broyage, digestion enzymatique et filtration sur tamis) ont donné des résultats comparables (55). On peut donc utiliser soit des cellules isolées soit des noyaux isolés. Le laboratoire évaluera et validera soigneusement les méthodes d'isolement des cellules/noyaux par type de tissu. Comme indiqué au paragraphe 40, la persistance de certaines des lésions conduisant à des cassures de brins d'ADN détectées par le test des comètes peut être très brève (40) (41). Quelle que soit la méthode employée pour préparer les suspensions de cellules/noyaux isolés, il importe donc que les tissus soient traités dès que possible après que les animaux ont été sacrifiés, et placés dans des conditions visant à réduire la disparition des lésions (maintien des tissus à basse température, par exemple). Il convient de conserver les suspensions cellulaires à très basse température jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être utilisées, afin de pouvoir mettre en évidence une variation inter-échantillons minimale et des réponses appropriées chez les témoins positifs et négatifs.

PRÉPARATION DES LAMES

La préparation des lames doit intervenir dès que possible après la préparation des cellules/noyaux isolés (dans l'heure qui suit, idéalement), mais la température et le temps écoulé entre le sacrifice des animaux et la préparation des lames doivent être rigoureusement contrôlés et validés dans les conditions du laboratoire. Le volume de suspension cellulaire ajouté à l'agarose à bas point de fusion (habituellement de 0,5 à 1,0 %) pour préparer les lames ne doit pas réduire le pourcentage d'agarose à bas point de fusion à moins de 0,45 %. La densité optimale de cellules sera déterminée par le système d'analyse d'image utilisé pour le comptage des comètes.

Lyse

Les conditions de lyse constituent également une variable critique pouvant interférer avec les cassures de brins résultant d'un type spécifique de modifications de l'ADN (alkylations et formation d'adduits aux bases de l'ADN). Il est donc recommandé de maintenir les conditions de lyse aussi constantes que possible pour toutes les lames au cours d'une même expérimentation. Une fois préparées, les lames sont immergées dans une solution de lyse réfrigérée pendant au moins une heure (ou toute une nuit) à une température de l'ordre de 2 à 8 °C, en lumière tamisée (lumière jaune, par exemple) ou en environnement étanche à la lumière, pour éviter l'exposition à la lumière blanche, qui peut contenir des composantes UV. Après cette période d'incubation, on rince les lames pour les débarrasser du détergent et des sels résiduels avant l'étape de déroulement alcalin. On utilisera pour ce faire de l'eau purifiée, un tampon neutralisant ou un tampon phosphate. Un tampon d'électrophorèse peut également être utilisé. L'objectif est de maintenir des conditions alcalines dans la chambre d'électrophorèse.

Déroulement et électrophorèse

Les lames sont placées de façon aléatoire sur le plateau d'une unité d'électrophorèse sur gels immergés contenant suffisamment de solution d'électrophorèse pour que la surface des lames soit entièrement recouverte (la profondeur d'immersion doit, elle aussi, être cohérente d'une épreuve à l'autre). Dans un autre type d'unité d'électrophorèse utilisé pour le test des comètes, c'est-à-dire avec refroidissement actif, circulation du liquide de refroidissement et alimentation haute tension, l'intensité du courant électrique sera d'autant plus forte que la hauteur de solution sera élevée, à tension constante. Les lames doivent être réparties de façon équilibrée dans la cuve d'électrophorèse afin d'atténuer les effets d'éventuelles tendances ou les effets de bord dans la cuve et de limiter les variations entre lots; il faut donc que pour chaque épreuve d'électrophorèse, on utilise le même nombre de lames provenant de chaque animal, et des échantillons des différents groupes de doses, des témoins négatifs et des témoins positifs. Les lames doivent rester au moins 20 minutes dans la cuve pour que l'ADN se déroule, puis sont soumises à l'électrophorèse dans des conditions contrôlées assurant une sensibilité et une plage dynamique maximales pour l'essai (c'est-à-dire garantissant des pourcentages d'ADN de queue acceptables, chez les témoins négatifs et positifs, pour assurer une sensibilité maximale). Le degré de migration de l'ADN est proportionnel à la durée de l'électrophorèse, ainsi qu'au potentiel (V/cm). D'après les essais du JaCVAM, celui-ci pourrait être de 0,7 V/cm pendant au moins 20 minutes. La durée de l'électrophorèse est considérée comme une variable critique et le temps d'électrophorèse doit être réglé de façon à optimiser la plage dynamique. Des durées plus longues (30 ou 40 minutes, par exemple, pour gagner en sensibilité) se traduisent habituellement par des réponses positives plus nettes pour des mutagènes connus. Cependant, un allongement de la durée de l'électrophorèse peut aussi se traduire par une migration excessive dans les échantillons témoins. Chaque expérience doit être réalisée à tension constante, et la variabilité des autres paramètres doit se situer dans une plage étroite et spécifiée, par exemple, dans les essais du JaCVAM, 0,7 V/cm avec une intensité initiale de 300 mA. La profondeur du tampon doit être ajustée pour réaliser les conditions requises, et maintenue tout au long de l'expérimentation. Il convient de consigner l'intensité du courant au début et à la fin de l'électrophorèse. Les conditions optimales doivent donc être déterminées au cours de la démonstration initiale de compétences par le laboratoire pour chaque tissu étudié. La température de la solution d'électrophorèse au cours du déroulement et de l'électrophorèse doit être maintenue à un niveau bas (2-10 °C, habituellement) (10). Il convient de consigner la température de la solution d'électrophorèse au début du déroulement, au début de l'électrophorèse et à la fin de l'électrophorèse.

Une fois l'électrophorèse terminée, les lames doivent être immergées/rincées dans le tampon de neutralisation pendant au moins 5 minutes. Les gels peuvent être colorés et observés à l'état «frais» (pendant 1 à 2 jours, par exemple) ou être déshydratés et observés ultérieurement (dans un délai de une à deux semaines après la coloration, par exemple) (56). Cependant, ces conditions doivent être validées lors de la démonstration de compétences et les données historiques doivent être recueillies et conservées séparément pour chacune de ces options. Dans le second cas, les lames doivent être déshydratées par immersion dans l'éthanol absolu pendant au moins cinq minutes, séchées à l'air libre puis stockées, soit à température ambiante, soit dans un récipient conservé au réfrigérateur jusqu'à la lecture.

Méthodes de mesure

L'évaluation quantitative des comètes fait appel à un système d'analyse d'image automatique ou semi-automatique. Les lames sont colorées par un colorant fluorescent approprié — SYBR Gold, Green I, iodure de propidium ou bromure d'éthidium, par exemple — et observées à un grossissement approprié (200x, par exemple) au microscope à épifluorescence équipé de détecteurs appropriés ou d'une caméra numérique (CCD, par exemple).

Les cellules peuvent être classées en trois catégories décrites dans l'atlas des images de comètes (57), à savoir mesurable, non mesurable, cellule fantôme (voir le paragraphe 55 pour plus de précisions). Seules les cellules mesurables (tête et queue clairement définies, pas d'interférence avec les cellules voisines) doivent être classées en fonction du pourcentage d'ADN de queue, pour éviter les artefacts. Il n'est pas nécessaire d'indiquer la fréquence des cellules non mesurables. La fréquence des cellules fantômes est évaluée par un examen visuel (l'absence de tête clairement définie ayant pour conséquence que ces cellules ne sont pas bien détectées par le système d'analyse d'image) portant sur au moins 150 cellules par échantillon (voir paragraphe 56 pour plus de précisions) et mentionnée à part.

Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment et évaluées «en aveugle», afin que l'analyste ignore à quel traitement elles correspondent. Pour chaque échantillon (par tissu et par animal), au moins 150 cellules (en dehors des cellules fantômes — voir paragraphe 56) doivent être analysées. L'évaluation de 150 cellules par animal chez au moins 5 animaux par dose (mais moins de 5 dans le groupe témoin positif concomitant — voir paragraphe 29) assure une puissance statistique satisfaisante, selon l'analyse de Smith *et al.*, 2008 (5). Si des lames sont utilisées, cela peut représenter l'évaluation de 2 ou 3 lames par échantillon pour des groupes de 5 animaux. Plusieurs zones de la lame doivent être observées à une densité garantissant l'absence de chevauchement des queues. L'évaluation en bord de lame est à éviter.

Les cassures de brins d'ADN dans le test des comètes peuvent être mesurées selon divers paramètres indépendants, tels que le pourcentage d'ADN de queue, la longueur de la queue ou le moment de la queue. Ces trois mesures peuvent être effectuées si l'on utilise un logiciel d'analyse d'image approprié. Cependant, le pourcentage d'ADN de queue (également appelé intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats (12) (40) (41) (42); il est déterminé par l'intensité des fragments d'ADN présents dans la queue, exprimée en pourcentage de l'intensité totale de la cellule (13).

Lésion des tissus et cytotoxicité

Des résultats positifs au test des comètes peuvent ne pas être dus exclusivement à la génotoxicité, la toxicité pour les tissus cibles pouvant aussi se traduire par une augmentation de la migration de l'ADN (12) (41). À l'inverse, une cytotoxicité faible ou modérée est souvent observée dans le cas des substances génotoxiques connues (12); le test des comètes ne permet donc pas à lui seul de distinguer une migration de l'ADN induite par la génotoxicité d'une migration induite par la cytotoxicité. Toutefois, lorsqu'une augmentation de la migration de l'ADN est observée, il est recommandé d'étudier au moins un indicateur de cytotoxicité, ce qui peut aider à interpréter les résultats. Une augmentation de la migration de l'ADN en présence d'éléments attestant clairement de la cytotoxicité d'un produit doit être interprétée avec prudence.

De nombreux critères de cytotoxicité ont été proposés et parmi eux, les altérations histopathologiques sont considérées comme fournissant une bonne évaluation de la toxicité tissulaire. Des observations telles qu'une inflammation, une infiltration cellulaire ou des modifications apoptotiques ou nécrotiques ont été associées à une augmentation de la migration de l'ADN; cependant, comme l'ont montré les essais de validation du JaCVAM (12), il n'existe pas de liste définitive de modifications histopathologiques systématiquement associées à une migration accrue de l'ADN. Les modifications de certains paramètres biologiques (AST, ALT, par exemple) peuvent aussi fournir des informations utiles sur les lésions des tissus, et d'autres indicateurs, tels que l'activation des caspases, le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL, la coloration à l'annexine V, etc., peuvent aussi être envisagés. Cependant, les données publiées sur l'utilisation de ces indicateurs dans des études *in vivo* sont limitées et ne sont peut-être pas toutes également fiables.

Les cellules fantômes sont des cellules dont l'image au microscope consiste en une tête de petite taille ou inexistante et une grande queue diffuse, et qui sont considérées comme très endommagées, bien que l'étiologie de ce phénomène soit incertaine (voir appendice 3). Du fait de leur apparence, la mesure du pourcentage d'ADN dans la queue par analyse d'image n'est pas fiable, et il convient donc de les évaluer séparément. L'occurrence de cellules fantômes doit être consignée et signalée, et toute augmentation importante de leur nombre attribuée au produit chimique testé doit être investiguée et interprétée avec soin. La connaissance du mode d'action potentiel des produits chimiques d'essai peut constituer une aide à cet égard.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

L'animal étant l'unité expérimentale, il convient de présenter sous forme de tableau les données animales individuelles et la synthèse des résultats. Du fait de la nature hiérarchique des données, il est recommandé de déterminer pour chaque lame le pourcentage médian d'ADN de queue et de calculer pour chaque animal la moyenne des médianes (12). La moyenne d'un groupe est obtenue en faisant la moyenne des moyennes individuelles des animaux qui le composent. Toutes ces valeurs doivent figurer dans le rapport. D'autres démarches peuvent être appliquées (voir paragraphe 53) si cela est justifié d'un point de vue scientifique et statistique. Pour l'analyse statistique, diverses approches sont possibles (58) (59) (60) (61). Lors du choix des méthodes statistiques, on tiendra compte de la nécessité de transformer éventuellement les données (en logarithmes ou en racines carrées, par exemple) et/ou d'ajouter un petit nombre (0.001, par exemple) à toutes les valeurs (même non nulles) pour atténuer l'incidence des valeurs nulles, comme il est expliqué dans les références ci-dessus. On trouvera à l'appendice 2 des précisions sur l'analyse des interactions traitement/sexe lorsque des animaux des deux sexes sont utilisés, et sur l'analyse subséquente des données selon que des différences sont observées ou non. Des données sur la toxicité et les signes cliniques doivent également figurer dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

- a. Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 16).
- b. Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 29) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant.
- c. Un nombre adéquat de cellules et de doses ont été analysées (paragraphe 52 et 36-38).
- d. Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits au paragraphe 36.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

- a. au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
- b. un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,
- c. des résultats se situent à l'extérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des cassures de brins d'ADN dans les tissus étudiés dans ce système d'essai. Si un ou deux seulement de ces critères sont remplis, voir le paragraphe 62.

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si:

- a. aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concurrent,
- b. un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,
- c. l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés,
- d. une preuve directe ou indirecte de l'exposition du/des tissu(s) cible(s) ou de la toxicité pour ce(s) tissu(s) est apportée.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures de brins d'ADN dans les tissus étudiés dans ce système d'essai.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive (c'est-à-dire que tous les critères des paragraphes 59 ou 60 ne sont pas remplis) et afin d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées si cela est justifié d'un point de vue scientifique. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales optimisées (espacement des doses, autres voies d'administration, autres moments d'échantillonnage ou autres tissus, par exemple).

Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif, et le résultat sera déclaré équivoque.

Pour évaluer la signification biologique d'un résultat positif ou équivoque, des informations sur la cytotoxicité pour le tissu cible sont nécessaires (voir paragraphes 54-55). Lorsque des résultats positifs ou équivoques sont observés uniquement en présence de signes clairs de cytotoxicité, on conclura à une étude équivoque pour ce qui est de la génotoxicité, à moins de disposer d'informations suffisantes pour permettre une conclusion définitive. En cas de résultats négatifs s'accompagnant de signes de toxicité à toutes les doses, il peut être judicieux de procéder à une étude complémentaire à des doses non toxiques.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot s'il est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, date limite d'utilisation, ou date de réanalyse, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Solvant/véhicule:

- justification du choix du solvant/véhicule;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;
- préparation des formulations à administrer;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple).

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée et justifications scientifiques et éthiques;
- nombre, âge et sexe des animaux;

- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, enrichissement environnemental, etc.;
- poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai, y compris fourchette, moyenne et écart type pour chaque groupe.

Conditions de l'essai:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);
- résultats de l'étude de détermination des doses (le cas échéant);
- justification du choix des doses;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai;
- justification de la voie d'administration;
- site d'injection (pour les études par voie sous-cutanée ou intraveineuse);
- méthodes de préparation des échantillons, analyses histopathologiques le cas échéant, en particulier pour les produits chimiques donnant un résultat positif au test des comètes;
- justification de la sélection du tissu;
- méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (ppm) et de la consommation, s'il y a lieu;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;
- description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage et justification des choix (données toxicocinétiques éventuelles, par exemple);
- méthode d'analgésie;
- méthode employée pour sacrifier les animaux;
- procédures d'isolement et de conservation des tissus;
- méthodes de préparation de la suspension de cellules/noyaux isolés;
- source et numéros de lots de tous les réactifs (lorsque c'est possible);
- méthodes d'évaluation de la cytotoxicité;
- conditions d'électrophorèse;
- techniques de coloration utilisées;
- méthodes de comptage et de mesurage des comètes.

Résultats:

- Observations cliniques générales, s'il y a lieu, avant et pendant toute la durée de l'essai pour chaque animal;
- données établissant la cytotoxicité, le cas échéant;
- pour les études d'une durée supérieure à une semaine: évolution du poids corporel de chaque animal au cours de l'étude, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart type pour chaque groupe; nourriture consommée;

- relation dose-réponse, le cas échéant;
- pour chaque tissu/animal, pourcentage d'ADN de queue (ou autre donnée, selon le paramètre choisi), valeurs médianes par lame, valeurs moyennes par animal et valeurs moyennes par groupe;
- données relatives aux témoins négatifs concomitants et aux témoins négatifs historiques, avec plages de valeurs, moyennes/médianes et écarts-types pour chaque tissu évalué;
- données relatives aux témoins positifs concomitants et aux témoins positifs historiques;
- pour les tissus autres que le foie, courbe dose-réponse correspondant au témoin positif. Cette courbe peut être établie à partir des données collectées au cours de l'établissement des compétences du laboratoire (voir paragraphes 16-17) et sera accompagnée d'une justification, avec des références à la littérature actuelle, montrant que l'ampleur et la dispersion des réponses aux témoins dans le tissu étudié sont appropriées;
- analyses et méthodes statistiques employées; critères appliqués pour considérer une réponse comme positive, négative ou équivoque;
- fréquence des cellules fantômes dans chaque groupe et par animal.

Discussion des résultats

Conclusions

Références

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. et al. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C. et al. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. et al (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. et al. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.
- (9) Singh, N.P. et al. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. et al. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (11) OCDE (2016), "Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015". Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.

- (12) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Série sur les essais et l'évaluation n°195 et 196, OCDE, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. et al. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. et al. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nessler, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.
- (25) Toyozumi, T. et al. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. et al. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. et al. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) Wang, A. et al. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

- (29) Burlinson, B. et al. (2007), *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. et al. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. et al. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. et al. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G., M. Vasquez, A. Hartmann (2009), The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- (35) Cordelli, E. et al. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhrer, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605 (1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. et al. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Møller, P. et al. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. et al. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. et al. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

- (47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123).
- (50) Chapitre B.8 de la présente annexe: Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (51) Chapitre B.29 de la présente annexe: Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41
- (54) OCDE (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 19, OCDE, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. et al. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.
-

Appendice 1

DEFINITIONS

Comète: nom donné à la forme que prennent les nucléoïdes soumis à un champ électrophorétique, en raison de sa similitude avec celle d'une comète: la tête correspond au noyau, et la queue est constituée de l'ADN migrant hors du noyau sous l'action du champ électrique.

Électrophorèse de cellules isolées en gel d'agarose en conditions alcalines: technique sensible pour la détection de lésions primaires de l'ADN au niveau de cellules/noyaux individualisés.

Intensité de la queue ou pourcentage d'AND de queue: correspond à l'intensité de fluorescence de la queue de la comète rapportée à l'intensité totale (tête plus queue). Représente l'ampleur des cassures de l'ADN, exprimée sous forme de pourcentage.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Variable/paramètre critique: désigne une variable d'un protocole expérimental dont une modification mineure peut avoir une forte incidence sur la conclusion de l'essai. Les variables critiques peuvent être spécifiques d'un tissu. Il importe de ne pas modifier les variables critiques, particulièrement en cours d'essai, sans tenir compte de l'incidence de ces modifications sur la réponse à l'essai, signalée par exemple par l'ampleur et la variabilité de la réponse des témoins positifs et négatifs. Le rapport d'essai doit préciser les modifications apportées aux variables critiques au cours de l'essai, ou par rapport au protocole standard du laboratoire, et justifier chacune de ces modifications.

*Appendice 2***PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER DES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS LE TEST DES COMÈTES IN VIVO****Le plan factoriel et son analyse**

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires)

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux progiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA ⁽¹⁾. En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) *Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable; toutefois, ils n'obtiendront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui remonte à des conceptions algorithmiques du calcul statistique développées à l'ère pré-informatique.

- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Appendice 3

LIMITES ACTUELLES DE L'ESSAI

Le test des comètes *in vivo* présente plusieurs limites liées à l'état actuel des connaissances. On peut s'attendre à ce que leur nombre diminue à l'avenir, ou à ce qu'elles soient définies de façon plus précise, à mesure que l'expérience acquise dans l'application du test apporte des réponses aux questions de sécurité, dans un contexte réglementaire.

1. Certains types de dommages à l'ADN peuvent être de courte durée, c'est-à-dire réparés trop rapidement pour être observables 24 heures ou plus après la dernière dose administrée. Il n'existe pas de liste validée des dommages de courte durée, ni des produits chimiques susceptibles de provoquer ce type de dommages, et l'on ignore combien de temps ces derniers restent détectables. Le moment d'échantillonnage optimal peut aussi être spécifique du produit chimique ou de la voie d'administration, et les moments d'échantillonnage doivent être établis d'après les données cinétiques (temps T_{\max} , auquel est atteint le pic de concentration dans le plasma ou le tissu, par exemple), lorsque ces données sont disponibles. La plupart des études de validation sur lesquelles s'appuie la présente méthode d'essai précise que la nécropsie doit intervenir 2 ou 3 heures après l'administration de la dernière dose. La plupart des études publiées font état d'une administration de la dernière dose de 2 à 6 heures avant le sacrifice des animaux. C'est donc sur ces bases que la présente méthode d'essai recommande d'administrer la dose finale à un moment spécifié entre 2 et 6 heures avant la nécropsie, sauf si des données incitent à procéder différemment.
2. Il n'existe pas de données validées relatives à la sensibilité du test pour la détection des dommages de courte durée à l'ADN consécutifs à l'administration dans les aliments ou l'eau de boisson, par comparaison avec l'administration par gavage. Des dommages à l'ADN ont été détectés après administration dans les aliments ou l'eau de boisson, mais les rapports d'essais réalisés par cette voie d'administration sont relativement peu nombreux, et l'on dispose d'une expérience beaucoup plus grande de l'administration par gavage ou par voie intrapéritonéale. La sensibilité du test pourrait donc être réduite dans le cas des produits chimiques induisant des dommages de courte durée, lorsque ces produits sont administrés dans les aliments ou l'eau de boisson.
3. Aucune étude interlaboratoires n'a été menée sur des tissus autres que le foie et l'estomac, et aucune recommandation n'a donc été établie sur la façon d'obtenir une réponse sensible et reproductible sur des tissus autres que le foie, avec par exemple les plages attendues pour les témoins positifs et négatifs. Pour le foie, il n'a pas non plus été possible de parvenir à un accord sur un abaissement de la limite pour les témoins négatifs.
4. Bien que plusieurs publications démontrent que la cytotoxicité *in vitro* constitue un facteur de confusion, très peu de données *in vivo* ont été publiées et il n'a donc pas été possible de recommander une mesure de cytotoxicité particulière. Des modifications histopathologiques telles qu'une inflammation, une infiltration cellulaire ou des modifications apoptotiques ou nécrotiques ont été associées à une augmentation de la migration de l'ADN; cependant, comme l'ont montré les essais de validation du JaCVAM (OCDE, 2014), ces modifications ne s'accompagnent pas toujours de résultats positifs dans le test des comètes et, de ce fait, il n'existe pas de liste définitive de modifications histopathologiques systématiquement associées à une migration accrue de l'ADN. Il a été suggéré d'utiliser les cellules fantômes comme indicateur de cytotoxicité, mais leur étiologie est incertaine. Selon certaines données, elles pourraient résulter de la cytotoxicité des produits chimiques, de dommages mécaniques/à induction enzymatique déclenchés lors de la préparation des échantillons (Guerard *et al.*, 2014) et/ou d'un effet extrême de la génotoxicité du produit chimique testé. D'autres données semblent indiquer qu'elles sont dues à des dommages importants mais peut-être réparables de l'ADN (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. La possibilité a été établie de congeler des tissus ou des noyaux cellulaires pour les analyser ultérieurement. Cela se traduit généralement par un effet mesurable sur la réponse au véhicule et au témoin positif (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012. Jackson *et al.*, 2013). Si le laboratoire a recours à cette pratique, il doit démontrer sa compétence en matière de congélation, et confirmer que les valeurs du pourcentage d'ADN de queue dans les tissus cibles des animaux traités par le véhicule sont suffisamment basses et que des réponses positives peuvent encore être détectées. La littérature décrit plusieurs méthodes de congélation des tissus. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'accord sur la meilleure façon de congeler et décongeler les tissus ni comment évaluer si une réponse potentiellement altérée peut affecter la sensibilité de l'essai.
6. Des travaux récents montrent que l'on peut s'attendre à ce que le nombre de variables critiques continue de baisser et à ce que les paramètres relatifs à ces variables soient définis plus précisément (Guerard *et al.*, 2014).

Références

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
 - (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
 - (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
 - (4) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Série sur les essais et l'évaluation, n° 196 et 195, OCDE, Paris.
 - (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
 - (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.»
-