

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

### Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours sur les rongeurs

#### INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques 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 Ligne directrice 408 originale a été adoptée en 1981. Des modifications y ont été apportées en 1998 afin de tirer davantage d'informations des animaux utilisés dans l'étude, à partir des conclusions d'une réunion OCDE de consultation d'experts sur les essais de toxicité chronique et subchronique, qui s'est déroulée à Rome en 1995 (1).
2. La présente ligne directrice a été mise à jour en 2018, l'objectif étant d'intégrer les paramètres endocriniens et d'améliorer ainsi la détection des effets potentiels des substances chimiques d'essai sur l'activité endocrinienne ; elle reprend les mises à jour de la Ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs).

#### REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité orale subchronique 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. Cette étude sur 90 jours fournit des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période prolongée, correspondant au développement des animaux d'essai entre le sevrage et le stade adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation de la substance d'essai, et peut livrer une estimation de la concentration (maximale) d'exposition sans

© OCDE (2018)

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

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

effet nocif observé (CSENO), celle-ci pouvant être utilisée pour sélectionner des valeurs de doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. Par ailleurs, cette étude fournit des données sur la relation dose-réponse qui permettent d'estimer le point de départ de l'évaluation des risques à l'aide de méthodes de modélisation appropriées (analyse des doses repères, par exemple).

4. La ligne directrice révisée met davantage l'accent sur les paramètres endocriniens afin de les combiner avec la sensibilité actuelle aux effets neurologiques et immunologiques ainsi qu'aux effets 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. Les paramètres suivants doivent être évalués, sachant qu'ils réagissent à la perturbation de la fonction thyroïdienne : le dosage de la thyroxine (T4), de la triiodothyronine (T3) et de la thyroïdostimuline (TSH) ainsi que la pesée de la glande thyroïde (2). De plus, les taux sériques de cholestérol total, de lipoprotéines de basse densité (LDL) et de lipoprotéines de haute densité (HDL) devraient également être déterminés, car ils sont directement contrôlés par l'action de l'hormone thyroïdienne et contribuent à mettre en évidence les effets sur la thyroïde (3). Les paramètres facultatifs correspondent au dosage d'autres hormones ainsi qu'à des évaluations des paramètres spermatiques. Les paramètres obligatoires et facultatifs qui peuvent être modifiés par des effets endocriniens sont énumérés à l'annexe 2. L'évaluation des paramètres facultatifs peut être envisagée si les informations dont on dispose sur le produit chimique d'essai ou sur des produits similaires tendent à montrer que les produits en question peuvent influencer sur les paramètres facultatifs ; sinon, ces derniers peuvent également être déclenchés par des observations des paramètres obligatoires mesurés dans le cadre de la présente ligne directrice. Cette étude devrait permettre de repérer les produits chimiques susceptibles d'avoir une action neurotoxique, endocrinienne, ou des effets sur le système immunitaire ou les organes reproducteurs, pouvant justifier des études plus approfondies.

5. 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 perturbateurs endocriniens » (8). La ligne directrice 408 mise à jour fait partie du niveau 4 de ce Cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets nocifs affectant les paramètres endocriniens pertinents.

6. Toutes les procédures de tests animaux obéiront aux normes en vigueur sur le traitement à leur réserver ; la description des soins et traitements décrits ci-dessous correspond à des normes de performance minimales qui seront adaptées, le cas échéant, à la législation locale si celle-ci est plus stricte. D'autres indications sur le traitement sans cruauté des animaux sont fournies dans le n° 19 de la collection de l'OCDE *Series on Testing and Assessment* (19).

7. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice figurent à l'annexe 1.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux d'expérience, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce durant au moins 90 jours. Pendant la période d'administration de la substance, on observe les animaux attentivement en vue d'y déceler d'éventuels symptômes de toxicité conformément aux recommandations de l'OCDE (19). Les animaux qui décèdent ou qui sont euthanasiés au cours de l'essai sont autopsiés et, à la fin

de l'essai, les animaux restants sont également euthanasiés et autopsiés à l'issue de la période d'administration de la substance.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### *Choix de l'espèce animale*

9. L'espèce préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs, la souris par exemple, puissent être utilisées. Si une autre espèce de rongeurs est utilisée pour l'étude des paramètres spécifiés dans la présente ligne directrice 408, les motivations de ce choix doivent être expliquées en détail. 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 des paramètres mesurés, la dissection d'organes plus petits posant des difficultés techniques. 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 neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder  $\pm 20$  pour cent 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.

### *Conditions d'encagement et d'alimentation*

10. Toutes les procédures de laboratoire se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection animale. La température de l'animalerie d'expérience doit être maintenue à 22°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). Idéalement, le taux d'humidité relative devrait se situer entre 50 et 60 pour cent, et doit atteindre au moins 30 pour cent et ne pas dépasser 70 pour cent de préférence, sauf pendant le nettoyage du local. On appliquera un éclairage artificiel avec une séquence de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux de laboratoire peuvent être alimentés par un régime standard avec eau potable ad libitum. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture. On veillera à éviter les régimes alimentaires ou la litière pouvant contenir des teneurs trop élevées de substances à action hormonale (phytoestrogènes à une teneur supérieure à 350  $\mu\text{g/d}$  d'aliment, par exemple) susceptibles d'interférer avec l'interprétation des résultats d'étude. Les animaux devraient être mis en cage en petits groupes du même sexe. Les animaux peuvent être mis en cage individuellement si cela est scientifiquement justifié, et la durée de la mise en cage individuelle doit être limitée à la période minimale nécessaire (5), (6), (7).

### *Préparation des animaux*

11. Il convient d'utiliser des animaux sains, ayant été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et qui n'ont pas encore été sujets d'expérience. L'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience devraient être précisés. Les animaux doivent être répartis au hasard dans les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il y a lieu d'attribuer un numéro d'identification distinct à chaque animal. 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.

### *Préparation des doses*

12. La substance d'essai doit être administrée par gavage oral après avoir été mélangée à des aliments ou dissoute dans de l'eau potable. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physicochimiques de la substance d'essai.

13. S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou suspendue dans un solvant adéquat. 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 finalement une solution dans d'autres solvants. La toxicité des solvants autres que l'eau doit être connue. L'homogénéité et la stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doivent être déterminées.

## MODE OPERATOIRE

### *Nombre et sexe des animaux*

14. Au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on envisage de sacrifier des animaux au cours de l'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur un produit de structure très proche, on envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire d'au moins 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 écoulée, la réversibilité ou la persistance potentielles de quelconques effets toxiques. La durée de cette période d'après traitement devrait être arrêtée en fonction des effets observés.

### *Dosage*

15. Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 18). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées ou de détermination de l'ordre de grandeur et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles concernant la substance d'essai ou de substances apparentées. À moins qu'elle ne soit limitée par la nature physico-chimique du produit chimique d'essai ou ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue d'induire un effet toxique, mais pas la mort ni d'intenses souffrances (voir le n° 19 de la collection de l'OCDE Series on Testing and Assessment (19)). Une séquence de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une 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 séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

16. Le groupe témoin sera un groupe non traité avec la substance d'essai ou un groupe recevant le solvant si la substance d'essai est administrée dans ce solvant. Exception faite du groupe traité avec la substance d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités d'une manière identique à ceux des groupes d'essai. Si un solvant est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de solvant utilisé. Si la substance d'essai est mélangée à des aliments et qu'elle entraîne une diminution de la

prise alimentaire, il peut être utile de prévoir un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si cette diminution de la prise alimentaire est due à la palatabilité des aliments ou à des altérations toxicologiques chez les animaux d'essai.

17. Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du solvant, selon le cas : 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.

### *Essai limite*

18. Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1000 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 lorsque l'exposition humaine implique l'utilisation d'une dose plus élevée.

### *Administration des doses*

19. Les animaux sont traités avec la substance d'essai sept jours par semaine pendant au moins 90 jours. Tout autre régime d'administration (cinq jours par semaine, par exemple) doit être justifié. En cas de gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation adaptée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. 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.

20. Si la substance d'essai est administrée après avoir été mélangée à des aliments ou dissoute dans de l'eau, il importe de veiller à ce que sa palatabilité ne perturbe pas l'équilibre nutritionnel ou hydrique normal. Lorsque la substance d'essai est administrée après avoir été mélangée à des aliments, on utilise soit une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une concentration ajustée si nécessaire pour que la dose reste constante par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel/jour, par exemple) ; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à peu près à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour que la dose reste constante par rapport au poids corporel de l'animal.

### *Observations*

21. La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Si un groupe satellite est inclus dans l'étude, les animaux du groupe satellite de récupération 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.

22. Il faudra effectuer des observations cliniques générales au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période où les effets prévus devraient être les plus marqués après l'administration. L'état clinique des animaux doit être noté. Deux fois par jour au minimum, généralement au début et à la fin de chaque journée, il y a lieu d'examiner tous les animaux afin d'y déceler des symptômes de morbidité et de mortalité (19).

23. Des observations cliniques détaillées doivent être pratiquées 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 observations doivent être effectuées à l'extérieur de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée et aux mêmes heures. Elles doivent être soigneusement notées, de préférence à l'aide d'un système de points, 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 excréctions, ainsi que l'activité autonome (sécrétion de larmes, horripilation, dimension de la pupille et respiration anormale, par exemple). 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, auto-mutilation, marche à reculons) (8, 19).

24. À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage équivalent approprié, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance d'essai 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.

25. Vers la fin de la période d'exposition et au plus tôt la onzième semaine, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (5) (auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (9), (10), (11) et évaluer la force de préhension (12) et l'activité motrice (13). Des détails supplémentaires au sujet des méthodes qui pourraient être suivies figurent dans les références respectives. Des méthodes non décrites dans les références peuvent aussi être appliquées.

26. Il n'est pas nécessaire de pratiquer les observations fonctionnelles vers la fin de l'étude si l'on dispose d'observations fonctionnelles provenant d'autres études ou si les observations cliniques quotidiennes n'ont pas révélé de troubles fonctionnels.

27. 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.

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

28. Tous les animaux devraient être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture doit 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. La mesure de la consommation d'eau peut également être envisagée pour les études basées sur le régime alimentaire ou le gavage.

*Hématologie et biochimie clinique*

29. Des prises de sang doivent être effectuées sur un endroit spécifié et stockées, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période expérimentale, des échantillons sont prélevés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

30. On procédera aux examens hématologiques suivants au terme de la période expérimentale et sur les prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant : hémocrite, teneur en hémoglobine, numération des érythrocytes et des réticulocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps/de la capacité de coagulation.

31. 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. Les déterminations effectuées sur le plasma ou le sérum devraient comprendre le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, la HDL, la LDL, 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 (l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyle transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase, par exemple). Des mesures d'enzymes supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, et de la bilirubine, peuvent également être incluses.

32. Les biochimies cliniques devraient être évaluées en tant que marqueurs potentiels de lésions tissulaires générales. 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 déterminées, de la méthémoglobine et de la cholinestérase. Ces analyses peuvent concerner certaines classes de produits chimiques ou bien être déterminées au cas par cas.

33. Le dosage sérique des hormones T4, T3 et TSH doit être effectué sur des échantillons prélevés sur chaque animal appartenant au groupe principal et à des groupes satellites de récupération à la fin de l'étude. Les autres hormones (testostérone, œstradiol, hormone folliculo-stimulante (FSH), hormone lutéinisante (LH), par exemple) doivent être dosées au cas par cas. On pourra congeler le sérum afin d'avoir le temps de déterminer quelles sont les analyses hormonales qui apportent le plus d'informations en fonction des résultats observés pour d'autres paramètres (poids des organes et histologie, par exemple). Les hormones peuvent être dosées dans le plasma sous condition de validation appropriée et si les données des témoins historiques sont disponibles.

34. Les facteurs suivants peuvent influencer sur la variabilité et les concentrations absolues lors de l'analyse hormonale :

- le moment de l'abattage, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales
- stade du cycle œstral

- la méthode d'abattage, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes
- les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.

35. Les échantillons de sang spécifiquement destinés à l'analyse des concentrations hormonales doivent être prélevés à peu près à la même heure de la journée. 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. Les taux d'hormones du groupe témoin (mesurés dans un même laboratoire, sur une même souche de rongeurs et toujours avec la même méthode) devraient être pris en compte pour faire la distinction entre les changements accidentels et les changements liés au traitement. Dans la mesure du possible, on utilisera les meilleures pratiques en matière de collecte, de manipulation et d'analyse des échantillons de sang (23). Les laboratoires s'efforceront, dans la mesure du possible, 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. La stabilité des hormone T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> et TSH dans les conditions choisies de stockage devrait être assurée lors de la validation de l'essai hormonal.

36. 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 masse spécifique, pH, protéines, glucose et sang/cellules sanguines.

37. Si les données antérieures de référence sont insuffisantes, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres d'hématologie et de biochimie clinique avant de commencer le dosage ; cependant, il est généralement déconseillé d'obtenir ces données avant le traitement (14).

### *Pathologie*

38. Au moment du sacrifice, on note le poids des testicules et des épидидymes de tous les mâles. Pour chaque mâle, au moins un épидидyme devrait être réservé à l'examen histopathologique. Les épидидymes restants peuvent être utilisés pour le dénombrement facultatif des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme ainsi que pour l'évaluation facultative de la morphologie et de la motilité des spermatozoïdes (15).

39. On conduira l'évaluation facultative 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. 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. Des têtes déformées ou larges peuvent indiquer des anomalies de la spermiation. La motilité des spermatozoïdes est évaluée immédiatement après l'abattage ou enregistrée en vidéo en vue d'une analyse ultérieure. Le pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles peut être déterminé visuellement ou grâce une analyse du mouvement assistée par ordinateur.

40. Les analyses des paramètres spermatiques peuvent être limitées aux mâles témoins et aux mâles exposés à des doses élevées. Toutefois, si l'on observe des effets liés au traitement, il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles.

41. Lors de l'autopsie, le cycle œstral de toutes les femelles devrait être déterminé grâce à des frottis vaginaux. Ces observations fourniront des informations sur le stade du cycle œstral atteint au moment de l'abattage et faciliteront l'évaluation histologique des tissus sensibles aux œstrogènes (document d'orientation de l'OCDE 106, partie 3 (17)).

### *Autopsie générale*

42. Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie générale, 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'ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes (peser d'abord l'ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes, puis disséquer et peser la prostate séparément), l'utérus, les ovaires, le thymus, la rate, l'encéphale et le cœur de tous les animaux (ces organes 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). L'hypophyse peut être pesée à l'état frais, immédiatement après dissection ou bien après fixation. Il convient d'enlever très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate, de façon à éviter toute ponction des vésicules séminales remplies de liquide. Une alternative consistera à débarrasser les vésicules séminales et la prostate des tissus adhérents et de les peser après fixation.

43. La pesée de la glande thyroïde doit être effectuée avec une extrême prudence, car des lésions tissulaires peuvent apparaître facilement (pour plus d'informations, voir la référence 20). Or les lésions tissulaires pourraient compromettre l'analyse histopathologique. Par conséquent, la découpe et la pesée de la thyroïde doivent être effectuées avec beaucoup de soin et de préférence après fixation.

44. 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 (16, 17) : 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, 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 ovaires, l'utérus, le cervix, le vagin, les testicules, les épидидymes, la prostate, les vésicules séminales, les glandes coagulantes, les glandes mammaires (mâles et femelles), la vessie, la vésicule biliaire (souris), les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie de la voie d'administration et un autre éloigné de cette voie, pour rendre compte des effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatique ou poplitée interne, de préférence tout près du muscle), un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (section ou, à défaut, ponction de moelle osseuse examinée directement), la peau et les yeux (si des changements ont été relevés au cours des examens ophtalmologiques). Il est recommandé de préserver les testicules par immersion dans du fixateur de Bouin ou du fixateur de Davidson modifié, et de procéder à la détermination du stade des sections transversales des tubules séminifères décrite (16) lors de l'évaluation histopathologique. On consultera également le document d'orientation de l'OCDE 106 (17) sur la fixation et l'évaluation histologique des organes endocriniens. Les observations cliniques et autres 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 évalués.

45. L'évaluation histopathologique des testicules doit être effectuée en portant une attention particulière aux effets propres à chaque stade, tel que décrit (14). Un examen histopathologique détaillé doit être effectué afin de mettre en évidence des effets liés au traitement, comme une rétention de spermatozoïdes, des couches ou des types de cellules germinales manquants, la présence de cellules géantes multinucléées ou le décollement des cellules spermatogènes dans la lumière des tubules séminifères (21). On consultera également le document d'orientation de l'OCDE 106 (17) sur la fixation et l'évaluation histologique des organes endocriniens.

### *Histopathologie*

46. 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 effets liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux appartenant aux groupes traités à toutes les autres doses.

47. Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

48. 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.

## RESULTATS ET RAPPORT

### *Résultats*

49. 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 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.

50. S'il y a lieu, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les résultats à analyser devraient être sélectionnés au stade de la conception de l'étude.

51. Pour le contrôle de la qualité, il est proposé que les données des témoins soient comparées aux valeurs des témoins historiques en provenance du même laboratoire, de la même espèce, de la même souche, et qu'elles soient recueillies dans des conditions similaires. De plus, les coefficients de variation sont calculés pour les paramètres endocriniens continus inscrits à l'Annexe 2. Ces données peuvent être utilisées à des fins de comparaison entre les études. Les différences entre les souches de rats doivent être prises en compte lors de l'évaluation des données des témoins historiques.

### *Rapport d'essai*

52. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

*Substance d'essai :*

- Source, numéro de lot et date limite d'utilisation, si c'est disponible;
- Stabilité de la substance, si elle est connue ;
- Nature physique et les propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- Identification par le numéro CAS, si connu ;
- Pureté ;

*Substance mono-constituant :*

- Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;

*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, le cas échéant :*

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

*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.
- justification du choix de l'espèce s'il ne s'agit pas de rats.

*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.

*Résultats :*

- poids corporel et variation de ce dernier ;
- 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);
- résultats de l'examen ophtalmologique ;
- évaluations portant sur l'activité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice (le cas échéant) ;
- tests hématologiques et valeurs normales de référence ;
- tests de biochimie clinique et valeurs normales de référence ;
- dosage des hormones thyroïdiennes circulantes (T4, T3, TSH ; obligatoire) ;
- dosage d'autres hormones (facultatif) ;
- méthode de détermination des valeurs hormonales (type d'essai, fournisseur, protocole, etc.) ;
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel ;
- résultats d'autopsie ;
- cytologie vaginale terminale ;
- description détaillée de tous les résultats 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 (facultatif) ;
- données relatives à l'absorption (informations fournies par l'ADME ou la TK, par exemple), le cas échéant ;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.
- Si des animaux ont été tués avant la date prévue pour le sacrifice, le motif de cette décision doit être communiqué.
- Si des animaux sont décédés au cours de l'étude, la cause du décès devrait, dans la mesure du possible, être établie.

*Discussion des résultats.*

*Conclusions.*

## LITERATURE

- (1) OECD (Rome, 1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing.
- (2) OECD (2006). Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 57
- (3) Kovanen P.T. (1987). Regulation of plasma cholesterol by hepatic low-density lipoprotein receptors. *Am Heart J.* 113(2 Pt 2):464-9.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) EEC Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal*, 29, L358, 18th December 1986.
- (6) National Research Council (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Edition. NIH Publication. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (7) Andersen M.L., D'Almeida V., Ko G.M., Martins P.J.F., Tufik S. (2016) Care and Maintenance of Laboratory Animals. In: Andersen M., Tufik S. (eds) *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. Springer, Cham
- (8) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. *Environmental Health Criteria Document* No. 60.
- (9) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (10) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health*, 9, 691-704.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) 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.

- (15) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N.R. Veeramachaneni, and L.D. Wise. (1996). Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237–244.
- (16) Russell, L.D; R.A. Ettlin; A.P. Sinha Hikim; E.D. Clegg. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River, Clearwater, FL* (1990).
- (17) OECD (2009). *Guidance Document for Histologic Evaluation and Reproductive Tests in Rodents*. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 106.Parts 1-6. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (18) OECD (2006). *Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407 Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats*. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 59. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (19) OECD (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](#).
- (20) US EPA (2005) *Guidance for Thyroid Assay in Pregnant Animals, Fetuses and Postnatal Animals and Adult Animals*. US EPA Office of Pesticide Programs, Washington, DC.  
[https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/thyroid\\_guidance\\_assay.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/thyroid_guidance_assay.pdf)
- (21) Creasy DM. (2002) *Histopathology of the male reproductive system II: interpretation*. *Curr Protoc Toxicol*. Nov;Chapter 16:Unit16.4.
- (22) Mondal S, Govindasamy M. 2017. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action. *Mol Cell Endoc*. 458: 91-104.
- (23) Kucheryavenko O, Lurman G, Lehman A, Bras J, Niemann L, Terron A, Chahoud I, Mantovani A, Håkansson H, Schneider S, Ritz V, Solecki R. (2018) *Report from the BfR Expert Hearing on Practicability of Hormonal Measurements*. *Arch Toxicol*. (in prep.) [voir : <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm> ]

**ANNEXE 1 : DÉFINITIONS**

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

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

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

**Activité antithyroïdienne** : c'est la capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T3) chez un organisme mammifère.

**Dosage** : terme général recouvrant la dose, sa fréquence et sa durée d'administration.

**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).

**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 ils doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de signes toxiques graves et d'une mortalité probable.

**HDL** Lipoprotéine de haute densité

**LDL** Lipoprotéine de basse densité

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

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

**T3 Triiodothyronine** – forme active de l'hormone thyroïdienne

**T4 Thyroxine** – le principal produit circulant de la glande thyroïde est converti en T3.

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

**TSH thyroïdostimuline** – hormone hypophysaire qui intervient dans la production des hormones thyroïdiennes par la glande thyroïde

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

## ANNEXE 2

## Paramètres recommandés pour la détection de l'activité endocrinienne

Paramètres obligatoires	Paramètres facultatifs
<b>Pesée des organes</b>	
testicules épидидymes glandes surrénales ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes utérus ovaires hypophyse glande thyroïde	
<b>Histopathologie</b>	
thyroïde et glandes parathyroïdes glandes surrénales hypophyse <sup>1</sup> testicules épидидymes prostate ventrale et dorsolatérale vésicules séminales et glandes coagulantes ovaires <sup>2</sup> col <sup>2</sup> vagin <sup>2</sup> utérus <sup>2</sup> frottis vaginal (effectué au moment de l'autopsie) visant à déterminer le stade du cycle œstral <sup>2</sup> glandes mammaires (mâles et femelles) <sup>2</sup>	îlots pancréatiques
<b>Biochimie sérique/plasmatique</b>	
Cholestérol total HDL LDL	
<b>Analyses hormonales sériques/plasmatiques</b>	
Thyroxine (T4) TSH T3	FSH LH œstradiol testostérone
<b>Paramètres spermatiques</b>	
réserves spermatiques stockées dans la queue de l'épididyme motilité des spermatozoïdes morphologie des spermatozoïdes	

<sup>1</sup> L'état des organes sensibles aux œstrogènes chez la femelle doit être évalué en fonction du stade du cycle œstral au moment du sacrifice, car les substances d'essai ayant des effets sur le système endocrinien peuvent induire des changements histologiques qui, sans être ouvertement pathologiques, peuvent différer de l'état prévu en fonction du stade du cycle ovarien (document d'orientation de l'OCDE 106, parties 3, 4 (17)).