

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

Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La Ligne directrice 409 originale a été adoptée en 1981. La présente version révisée est destinée à tirer davantage d'informations des animaux utilisés dans l'étude.

2. La présente version révisée de la Ligne directrice 409 repose en grande partie sur les conclusions d'une réunion OCDE de consultation d'experts sur les essais de toxicité chronique et subchronique, qui s'est déroulée à Rome les 2 et 3 novembre 1995 (1).

REMARQUES PRELIMINAIRES

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. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les risques 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 peut livrer une estimation de la concentration (maximale) d'exposition sans effet nocif observé, celle-ci pouvant être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

4. La Ligne directrice révisée permet de mettre en évidence les effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques chez des non-rongeurs et on ne doit y avoir recours que :

- si les effets observés dans d'autres études font ressortir la nécessité d'éclaircir et de préciser certains points chez une deuxième espèce n'appartenant pas aux rongeurs ou
- si 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
- si d'autres raisons précises justifient l'utilisation d'une espèce de non-rongeur.

5. Certains termes utilisés sont définis à l'annexe.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. 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 pendant une période de 90 jours. Pendant la période d'administration, on observe les animaux attentivement, afin d'y 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.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Sélection de l'espèce animale

7. L'espèce de non-rongeur couramment utilisée est le chien, de préférence d'une race définie ; on se sert fréquemment du beagle. D'autres espèces, par exemple le porc ou le porc nain, peuvent aussi être utilisées. Les primates ne sont pas recommandés et leur utilisation devrait être justifiée. Il convient d'employer de jeunes animaux sains 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 pas plus tard qu'à 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.

Conditions d'encagement et d'alimentation

8. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'y incorporer correctement la substance d'essai, lorsqu'elle est administrée par cette voie. Les cages doivent être adaptées à l'espèce. On appliquera de préférence un éclairage artificiel avec une séquence de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les conditions d'encagement et d'alimentation doivent être conformes aux prescriptions particulières pour l'espèce sélectionnée, stipulées dans les lois et les directives faisant autorité en la matière (2)(3)(4).

Préparation des animaux

9. Il convient d'utiliser de jeunes animaux sains 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 source. 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 dans les groupes traités et le groupe témoin. Les cages devraient 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.

Préparation des doses

10. La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou 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 physico-chimiques de la substance d'essai.

11. S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou suspendue dans un véhicule 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 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.

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

12. Il faudrait employer au moins huit animaux (quatre femelles et quatre 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 huit animaux (quatre 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 d'après-traitement devrait être fixée en fonction des effets observés.

Dosage

13. Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 16). 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 existant au sujet de la substance d'essai ou de substances apparentées. La dose la plus élevée doit être choisie en vue d'induire un effet toxique, mais pas la mort ni d'intenses souffrances, à moins qu'elle ne soit limitée par la nature physico-chimique de la substance d'essai ou ses effets biologiques. Une séquence de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration (maximale) 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 séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

14. Le groupe témoin sera un groupe non-traité avec la substance d'essai ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de 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, 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.

15. Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, 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 et d'eau ou sur l'état nutritionnel des animaux.

Essai limite

16. 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

17. Les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Un autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une seule dose 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 d'expérience. 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.

18. 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.

Observations

19. 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.

20. 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. Au moins deux fois par jour, 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.

21. 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, si possible, à l'extérieur de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée et aux mêmes heures. 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 excréctions, ainsi que l'activité autonome (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, dimension 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.

22. A l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage équivalent approprié, 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 liés au traitement dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

23. Tous les animaux devraient 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 devrait aussi être mesurée au moins une fois par semaine. La consommation d'eau peut également être surveillée dans les études où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, au cours desquelles la prise d'eau risque d'être modifiée.

Hématologie et biochimie clinique

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

25. Au début de l'essai et ensuite soit tous les mois, soit à mi-chemin et à la fin de la période d'essai, il y a lieu d'effectuer un examen hématologique portant sur 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.

26. 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 à mi-chemin et à la fin de l'essai. Les paramètres qui devraient être analysés comprennent l'équilibre électrolytique, le métabolisme des glucides et les fonctions hépatiques et rénales. La sélection d'analyses déterminées dépendra d'observations sur le mode d'action de la substance d'essai. Les animaux devraient jeûner durant une période dépendant de l'espèce avant de subir une 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.

27. Les analyses d'urine devraient être pratiquées au moins au début, à mi-parcours et au terme de l'essai, sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés. Les paramètres à relever sont l'apparence, le volume, l'osmolalité ou la masse spécifique, 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.

28. 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 acide-base, 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 au cas par cas.

29. 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.

Pathologie

Autopsie générale

30. 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 et la vésicule biliaire, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, les ovaires, l'utérus, la thyroïde (et les glandes parathyroïdes) le thymus, la rate, le cerveau et le coeur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être débarrassés de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation.

31. 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, les yeux, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'oesophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les reins, les capsules surrénales, la rate, le coeur, 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 de la voie d'administration et un autre éloigné de cette voie, pour rendre compte des effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatiques ou tibiaux), de préférence tout près du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou une ponction de moelle osseuse examinée directement) et la peau. 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 conservés.

Histopathologie

32. 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 des groupes traités à toutes les autres concentrations.

33. Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.
34. 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

35. 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.
36. 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.

Rapport d'essai

37. Le rapport d'essai doit contenir 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'expérience :

- espèce et race utilisée ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.
- poids de chaque animal au début de l'essai.

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 ;
- tests hématologiques et valeurs normales de référence ;
- tests 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.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (Rome, 1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing.
- (2) Directive du Conseil 86/609/CEE, du 24 novembre 1986, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres, relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Journal officiel, 29, L358, 18 décembre 1986.
- (3) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (4) 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.

ANNEXEDEFINITIONS

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.

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.