



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

« **Étude de Toxicité pour la Reproduction sur
Une Génération** »

1. INTRODUCTION

• Connaissances requises

- Nature de la substance à tester, solide, liquide, gaz ou vapeur
- Identification chimique de la substance à tester
- Degré de pureté (impuretés) de la substance à tester
- Caractéristiques de solubilité
- Point de fusion/d'ébullition (le cas échéant)
- pH (le cas échéant)

• Documents de référence

Il n'existe pas de normes internationales à ce sujet.

2. MÉTHODE

A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE,
APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI

Cette Ligne directrice pour les essais sur la reproduction est destinée à fournir des informations générales concernant les effets d'une substance à tester sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, tels que la fonction génitale, le cycle œstral, le comportement lors de l'accouplement, la conception, la parturition, la lactation et le sevrage. Cette Ligne directrice n'est pas destinée à déterminer la cause et les effets spécifiques dans chaque cas et, pour l'étude des substances administrées par inhalation, des modifications seront nécessaires. L'étude en question peut également fournir des informations préliminaires sur les effets toxiques de la substance à tester sur le développement, effets tels que la morbidité néonatale, la mortalité, le comportement et la tératogenèse ; cette étude peut servir de guide pour des essais ultérieurs.

« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur Une Génération »

- Principe de la méthode

La substance à tester est administrée à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de mâles et de femelles. Les mâles doivent recevoir les doses au cours de leur croissance et pendant une durée correspondant au minimum à un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de mettre en lumière tous les effets nocifs de la substance à tester sur la spermatogénèse.

Les femelles de la génération parentale (génération P) doivent recevoir les doses pendant une période correspondant au moins à deux cycles œstraux complets afin de découvrir tous les effets nocifs de la substance à tester sur l'œstrus. Les animaux sont alors accouplés. La substance à tester est administrée aux animaux des deux sexes durant la période d'accouplement et ensuite seulement aux femelles pendant la gestation et tout au long de la période d'allaitement.

B. MODE OPÉRATOIRE

- Préparations

De jeunes animaux adultes et sains sont choisis au hasard et répartis entre les groupes d'exposition. Ces animaux sont maintenus dans des cages pendant au moins cinq jours afin de permettre leur acclimatation. Il est recommandé d'administrer la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson. Dans les voies d'administration sont également acceptables. Tout au long de la période expérimentale appropriée, la substance soit être administrée à tous les animaux selon la même méthode. Si on utilise un véhicule ou d'autres additifs afin de faciliter l'administration du produit étudié, ceux-ci doivent être connus pour leur absence d'effets toxiques. L'administration doit se faire sur une base de 7 jours par semaine.

- Animaux d'expérience

Choix des espèces

Cette Ligne directrice est destinée à être utilisée pour les rats ou les souris. Si on emploie d'autres espèces, il sera nécessaire d'apporter les modifications appropriées. On ne doit pas utiliser de souches dont la fécondité est faible. On doit employer des animaux sains, qui n'ont pas été soumis à des expériences antérieures. Pour les animaux d'expérience on doit définir l'espèce, la souche, le sexe, le poids et/ou l'âge.

**« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur
Une Génération »**

Nombre et sexe

Chacun des groupes d'essai ou de contrôle doit contenir un nombre suffisant d'animaux afin de fournir environ 20 femelles gravides à leur terme ou presque. (Pour les substances qui provoquent la stérilité, il se peut que cela ne soit pas possible). Le but est d'obtenir suffisamment de gestations et de petits pour permettre une évaluation sérieuse de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gestation et le comportement maternel des animaux de la génération P, et sur la période d'allaitement, la croissance et le développement de la descendance F₁, depuis la conception jusqu'au sevrage.

Conditions d'encagement et d'alimentation

La température de l'animalerie d'expérience doit être de 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$), avec un taux d'humidité relative de 30 à 70 pour cent. Si l'on fait appel à la lumière artificielle, la séquence d'éclairage doit être de 12 heures de clarté et de 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire sera le régime de laboratoire classique avec eau potable à satiété. Les femelles gravides doivent être placées dans des cages individuelles et on peut leur fournir de quoi faire leur nid.

• Conditions expérimentales

Niveaux de dose

On doit disposer d'au moins trois groupes d'animaux traités et d'un groupe témoin. Si pour administrer la substance à tester on utilise un véhicule, les animaux du groupe témoin doivent recevoir une quantité de celui-ci égale à la plus grande quantité utilisée dans l'essai. Si la substance à tester entraîne une réduction de la prise ou de l'utilisation de la nourriture, il peut alors être nécessaire d'employer un groupe témoin recevant la même quantité moindre de nourriture. Idéalement, à moins d'être limité par la nature physico-chimique ou par les effets biologiques de la substance à tester, chez les animaux de la génération P, la dose la plus importante doit provoquer des effets toxiques, mais elle ne doit pas entraîner la mort.

Idéalement, la ou les doses intermédiaires doivent provoquer le minimum d'effets toxiques imputables à la substance à tester et la dose la plus faible ne doit entraîner aucun effet nocif observable sur les parents ou sur leurs descendants.

« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur Une Génération »

Quand elle est administrée par gavage ou en capsule, la dose donnée à chaque animal doit être basée sur le poids corporel de celui-ci et elle doit être ajustée un fois par semaine selon les modifications de ce poids. Pour les femelles en cours de gestation, on peut, si on le désire, baser le dosage sur la mesure quotidienne du poids corporel ou bien sur le poids au jour 0 ou au 6^{ème} jour de la gestation.

Essai-limite

Dans le cas des substances dont des études à doses répétées ont montré qu'elles étaient faiblement toxiques, si une dose d'au moins 1000 mg/kg n'entraîne aucun signe d'interférence avec le fonctionnement de la reproduction, on peut considérer comme non nécessaire d'effectuer des essais à d'autres niveaux de dose. Si au cours d'une étude préliminaire réalisée avec une dose élevée qui entraîne des signes nets de toxicité chez la mère, il n'apparaît aucun effet nocif sur la fertilité, on peut considérer comme non nécessaire d'effectuer des études à d'autres niveaux de dose.

- Exécution de l'essai

Programmes des expériences

Pour les mâles de la génération parentale (P), l'administration quotidienne de la substance à tester doit débuter quand ils sont âgés de cinq à neuf semaines environ, après qu'ils aient été sevrés et acclimatés pendant au moins cinq jours. Chez les rats, l'administration est continue durant les six semaines précédant la période d'accouplement (huit semaines pour les souris). Les mâles doivent être sacrifiés et examinés à la fin de la période d'accouplement ou bien maintenus dans les conditions de l'essai afin d'engendrer éventuellement une seconde portée et ils doivent être sacrifiés et examinés quelque temps avant la fin de l'expérimentation.

Pour les femelles de la génération parentale (P), l'administration de la substance à tester doit débuter après une période d'acclimatation minimale de cinq jours et doit se poursuivre pendant au moins deux semaines avant l'accouplement. L'administration quotidienne aux femelles P de la substance à tester doit se poursuivre tout au long de la période d'accouplement de trois semaines, durant la gestation et jusqu'au sevrage des petits de la génération F₁.

« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur Une Génération »

Le programme d'administration de la substance d'essai doit être étudié en fonction des informations disponibles sur ce produit telles que l'induction de son métabolisme ou sa bio-accumulation.

Déroulement de l'accouplement

Dans cette étude, on peut utiliser soit des accouplements 1:1 (un mâle pour une femelle), soit des accouplements 1:2 (un mâle pour deux femelles). Pour l'accouplement 1:1, une femelle doit être gardée avec le même mâle jusqu'à ce qu'il y ait gestation ou durant une période de trois semaines. Les femelles doivent être examinées tous les matins afin de rechercher la présence de sperme ou de bouchons vaginaux. On prend comme jour de la gestation le jour où l'on trouve un bouchon vaginal ou du sperme.

On doit examiner les couples où il n'y a pas d'accouplement afin de déterminer la cause de leur stérilité apparente. Ceci peut nécessiter des procédés tels que des possibilités supplémentaires de s'accoupler avec des animaux dont la fertilité est prouvée, un examen microscopique des organes reproducteurs et un examen du cycle œstral ou de la spermatogénèse.

Taille des portées

On laisse les animaux traités durant la période de fertilité mettre bas normalement et élever leur progéniture jusqu'à la période du sevrage, sans normalisation.

Si une normalisation est faite, la procédure suivante est recommandée. Au quatrième jour après la naissance, la taille de chaque portée peut être ajustée en éliminant des petits par sélection afin de se rapprocher le plus près possible du nombre de quatre mâles et quatre femelles par portée. Il n'est pas indiqué d'éliminer seulement les plus petits. Quand le nombre de mâles et de femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre animaux de chaque sexe par portée, un ajustement partiel est acceptable (par exemple, cinq mâles et trois femelles). On ne pratique pas d'ajustement pour les portées comprenant moins de huit petits.

• Observations

Tout au long de la période d'essai, chacun des animaux doit être examiné au moins une fois par jour. On doit noter les modifications intéressantes du comportement, les indices d'une

**« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur
Une Génération »**

parturition difficile ou prolongée et tous les signes de toxicité y compris la mortalité. Durant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, la consommation de nourriture doit être mesurée chaque semaine. Pendant la gestation, la mesure quotidienne de la consommation de nourriture est facultative. Après la mise bas et durant l'allaitement, les mesures de consommation de nourriture doivent être faites le même jour que la pesée des portées. Les mâles et les femelles de la génération P doivent être pesés le premier jour du traitement et ensuite une fois par semaine. Les observations doivent être notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation doit être calculée à partir du jour 0 de la gestation. Chaque portée doit être examinée aussitôt que possible après la délivrance afin d'établir le nombre et le sexe des petits, des morts-nés, des vivants ainsi que la présence de grosses anomalies. Les petits morts ainsi que ceux qui sont tués à 4 jours doivent être conservés et examinés afin de trouver des défauts éventuels.

Les petits vivants doivent être comptés et les portées pesées le matin suivant la naissance, les 4^{ème} et 7^{ème} jour, puis chaque semaine jusqu'à la fin de l'étude. À ce dernier moment les animaux doivent être pesés individuellement. On doit noter les anomalies physiques ou de comportement observées chez les mères ou chez les petits.

- Anatomo-Pathologie

- Autopsie générale*

Au moment du sacrifice ou de la mort au cours de l'étude, on doit examiner les animaux de la génération P au niveau microscopique, afin de rechercher toute anomalie structurale ou toute modification pathologique, en prêtant une attention particulière aux organes du système reproducteur. On doit examiner les petits morts ou moribonds pour des défauts éventuels.

- Histopathologie*

Les ovaires, l'utérus, le cervix, le vagin, les testicules, les épидидymes, les vésicules séminales, la prostate, la glande coagulante, l'hypophyse et le ou les organes cibles de tous les animaux de la génération P doivent être conservés en vue de leur examen microscopique, si nécessaire. Au cas où ces organes n'auraient pas été examinés au cours d'autres études réalisées

**« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur
Une Génération »**

avec des doses multiples, ils doivent être étudiés au microscope pour tous les animaux traités à haute dose, pour tous les animaux témoins et pour les animaux morts en cours d'étude, si cela est possible. Les organes qui présentent des anomalies chez ces animaux doivent alors être examinés chez tous les autres animaux de la génération P. Dans ces cas-là, on doit faire un examen microscopique de tous les tissus montrant des modifications pathologiques importantes. Comme cela est suggéré dans le paragraphe sur le déroulement de l'accouplement, les organes reproducteurs des animaux soupçonnés de stérilité peuvent être soumis à un examen microscopique.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

• Traitement des résultats

Les résultats peuvent être résumés sous la forme de tableaux, faisant apparaître pour chaque groupe d'essai le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de mâles fertiles, le nombre de femelles gravides, les types des modifications et le pourcentage d'animaux pour chaque type de modification.

Quand cela est possible, les résultats numériques doivent être 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.

• Evaluation des résultats

Les résultats d'une étude de toxicité pour la reproduction doivent être évalués d'après les effets observés, les résultats d'autopsie et l'examen microscopique. L'évaluation comportera le rapport entre, d'une part, la dose de la substance à tester et d'autre part la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris la fertilité, les anomalies cliniques, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique. Une étude sur la reproduction correctement menée doit fournir une estimation satisfaisante du niveau sans effet et elle doit permettre de comprendre les effets nocifs sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et la croissance postnatale.

**« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur
Une Génération »**

• R a p p o r t

Le rapport d'essai doit également contenir les renseignements suivants :

- espèce/souche utilisée
- résultats concernant les effets toxiques par sexe et par niveau de dose, comprenant la fertilité, la gestation et les signes de viabilité
- instant de la mort si celle-ci survient au cours de l'étude, ou indication de la survie des animaux à la fin de l'expérience
- tableau présentant les poids de chaque portée, les poids moyens des petits et les poids individuels des petits à la fin de l'étude
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, les petits, la croissance postnatale, etc.
- jour de l'observation de chaque signe anormal et description de son développement ultérieur
- données sur le poids corporel des animaux de la génération P
- résultats d'autopsie
- description détaillée de tous les résultats des examens microscopiques, quand ils ont été réalisés
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

• I n t e r p r é t a t i o n d e s r é s u l t a t s

Une étude de toxicité pour la reproduction fournira des renseignements sur les effets d'une exposition répétée à une substance par voie orale. Les résultats de cette étude doivent être interprétés conjointement avec les conclusions des études subchroniques, tératogènes et autres. L'extrapolation à l'homme des résultats de cette étude n'a de valeur que dans une mesure limitée, mais elle peut fournir des informations utiles sur les niveaux sans effet et sur le niveau d'exposition admissible pour l'homme.

« Étude de Toxicité pour la Reproduction sur
Une Génération »

4. BIBLIOGRAPHIE

1. E.I. Goldenthal, *Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use*. Drug Review Branch, Division of Toxicological Evaluation, Bureau of Science, Federal Drug Administration, Washington, D.C. (1966).
2. T. Hasegawa, M. Hayashi, F.J.G. Ebling and I.W. Henderson, *Fertility and Sterility*. Elsevier, New York (1973).
3. E.F. Oakberg, *Am. J. Anat.* 99, 507-516 (1956).
4. E.C. Roosen-Runge, *Biol. Rev.* 37, 343-377 (1962).
5. R.D. Yates and M. Gordon, *Male Reproductive System*. Masson, New York (1977).
6. National Academy of Sciences, *Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances*, (Washington, 1977).
7. A.K. Palmer, in *Handbook of Teratology*, Vol. 4 (edited by J.G. Wilson and F. Clarke Graser) Plenum Press, New York (1978).
8. A.K. Palmer, in *Developmental Toxicology* (edited by C.A. Kimmel and J. Buelke-Sam) Raven Press, New York (1981).

Date effective d'annulation: 27 décembre 2019