

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

Adoptée par le Conseil le 27 juillet 1995

Neurotoxicité différée de substances organophosphorées à la suite d'une exposition aiguë

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont périodiquement revues à la lumière des progrès scientifiques. Lors de ces révisions, une attention particulière est portée au bien-être des animaux. Cette mise à jour de la Ligne directrice 418 fait appel à des méthodes révisées comprenant la mesure de l'inhibition de l'estérase génératrice de neuropathie (précédemment estérase neurotoxique, NTE) pour déterminer les effets d'une dose suffisamment élevée. Cette nouvelle méthode ne requiert plus l'administration d'une dose répétée au 21^{ème} jour (1)(2)(3). L'inhibition de la NTE dans le cerveau et dans la moelle épinière pendant les 24 à 48 heures suivant l'administration de la dose montre une bonne corrélation avec les effets cliniques et morphologiques de neurotoxicité observés 10 à 20 jours plus tard. On a trouvé que le modèle d'essai de la NTE est applicable à tous les esters organophosphorés dont on sait qu'ils causent des neuropathies différées chez l'homme (4). En conséquence, les informations quantitatives sur l'inhibition de la NTE permettront de mieux savoir si les résultats ambigus observés quelquefois dans les études de comportement ou les examens histopathologiques doivent être imputés à la présence d'une substance potentiellement neurotoxique à effet différé (1)(2)(3)(4).

2. La présente mise à jour de la Ligne directrice 418 est issue d'une réunion consultative du Groupe de travail ad hoc d'experts sur la neurotoxicité systémique à court terme (et différée), tenue à Paris en février 1992 (5). Elle est fondée sur une proposition antérieure, débattue lors de la Réunion ad hoc de l'OCDE sur les essais de neurotoxicité, tenue à Arlington (USA) en mars 1990 (6), et tient compte des commentaires des pays Membres sur cette proposition.

REMARQUES PRELIMINAIRES

3. Dans l'estimation et l'évaluation des effets toxiques de substances chimiques, il est important de considérer que certaines classes de substances peuvent causer des neurotoxicités telles qu'elles pourraient ne pas être détectées dans d'autres études de toxicité. On a observé que certains composés organophosphorés provoquent une neurotoxicité différée et qu'ils pourraient se prêter, de ce fait, à une évaluation au moyen de la présente Ligne directrice (7,8) (voir Annexe). En outre, on pourrait utiliser des tests de dépistage *in vitro* pour identifier les substances chimiques susceptibles de provoquer des polyneuropathies différées (9)(10)(11). Cependant, des résultats négatifs d'études *in vitro* ne permettent pas de conclure que la substance testée n'est pas neurotoxique.

4. Des résultats négatifs obtenus pour les domaines d'observation retenus dans cette Ligne directrice (biochimie, histopathologie et observation du comportement) peuvent normalement indiquer qu'il n'est pas nécessaire de procéder à d'autres essais de neurotoxicité différée. En revanche, l'obtention de résultats équivoques et non-concluants pour ces domaines d'observation pourrait indiquer la nécessité de pousser plus à fond les évaluations.

5. On trouvera en annexe les définitions de certains termes utilisés.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Une dose unique de la substance à tester est administrée par voie orale à des poules domestiques qui ont été protégées, s'il y a lieu, contre des effets parasymphomimétiques aigus. Les animaux sont observés pendant au moins 21 jours afin de déceler des anomalies de comportement, des ataxies et des paralysies. Des analyses biochimiques, en particulier de NTE, sont effectuées sur des poules choisies au hasard dans chaque groupe, normalement 24 et 48 heures après l'administration de la dose. Vingt et un jours après l'exposition, les animaux survivants sont sacrifiés et on procède à un examen histopathologique de certains tissus neuraux (voir paragraphe 23).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces animales

7. Il est recommandé d'utiliser de jeunes poules pondeuses domestiques adultes (*Gallus gallus domesticus*), âgées de 8 à 12 mois. On doit utiliser des races et des souches de taille normale et normalement des poules qui ont été élevées dans des conditions leur permettant de se mouvoir librement.

Conditions d'encagement et d'alimentation

8. On doit utiliser des cages ou des enclos suffisamment spacieux pour permettre aux poules de se mouvoir librement et pour faciliter l'observation de leur démarche. Quand l'éclairage est artificiel, il faut prévoir une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les animaux doivent recevoir une alimentation appropriée et disposer d'une quantité non limitée d'eau potable.

Préparation des animaux

9. De jeunes poules adultes et saines, exemptes de maladies virales et de médication, ne présentant pas d'anomalie de la démarche, doivent être acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours, avant d'être réparties au hasard entre les groupes traités et les groupes témoins.

Voie d'administration et préparation des doses

10. L'administration de la substance d'essai se fait normalement par voie orale, soit par gavage, soit par l'intermédiaire de gélules de gélatine ou d'une méthode analogue. Les substances liquides peuvent être administrées à l'état pur ou être dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs. Les substances solides doivent être dissoutes, dans toute la mesure du possible, étant donné que des doses importantes de matières solides encloses dans des gélules de gélatine peuvent échapper en partie à l'absorption. Si l'on utilise des véhicules non aqueux, il faut connaître leurs propriétés toxiques et, si celles-ci ne sont pas connues, elles doivent être déterminées avant l'essai.

MODE OPERATOIRE

Nombre d'animaux et de groupes traités

11. Outre le groupe traité, il faut constituer deux autres groupes, l'un servant de témoin pour les effets du véhicule et l'autre servant de témoin positif.

12. Le groupe traité et le groupe témoin du véhicule doivent contenir un nombre de poules suffisant pour que six d'entre elles puissent être sacrifiées pour les examens biochimiques (des groupes de trois à deux moments différents) et pour que six soient encore en vie au 21^{ème} jour de la période d'observation et puissent servir aux examens pathologiques.

13. Le groupe témoin du véhicule doit être traité exactement de la même manière que le groupe traité, mise à part l'administration de la substance d'essai.

14. Le groupe témoin positif peut être suivi en même temps que le groupe traité mais il peut également s'agir du groupe témoin d'un essai antérieur. Il doit contenir au moins six poules, auxquelles on administre une substance neurotoxique à effet différé connu. Trois poules sont destinées aux analyses biochimiques et les trois autres aux études de pathologie. Une substance neurotoxique largement utilisée est par exemple le tri-o-crésylphosphate (TOCP). Il est recommandé de remettre à jour périodiquement les données historiques. Il convient de mettre au point de nouvelles données applicables au groupe témoin positif lorsque l'un ou l'autre élément essentiel de la procédure d'essai (la souche, l'alimentation ou l'encagement, par exemple) a été modifié par le laboratoire.

Etude préliminaire pour le choix de la dose

15. Une étude préliminaire doit être exécutée sur un nombre adéquat d'animaux et de groupes de dose afin de définir le niveau de dose à utiliser dans l'étude principale. L'objectif est de porter au niveau maximal la dose à utiliser dans l'étude principale étant donné que les résultats de cette étude de toxicité aiguë serviront à déterminer si une étude sur 28 jours est nécessaire. Un certain taux de mortalité sera inévitablement observé dans cette étude préliminaire afin de définir le niveau de dose à utiliser dans l'étude principale. Toutefois, il est possible de prévenir les décès dus à des effets parasymphomimétiques aigus, en utilisant de l'atropine ou un autre agent protecteur dont on est sûr qu'il n'interfère pas avec les symptômes de neurotoxicité différée. On dispose de diverses méthodes d'essai pour estimer la dose maximale non létale d'une substance d'essai (voir Ligne directrice 420). On peut également se baser sur les données antérieures relatives à la poule ou sur d'autres informations de toxicologie pour choisir le niveau de dose.

Essai limite

16. Si un essai effectué au moyen de la méthode décrite ci-dessus avec une dose d'au moins 2 000 mg/kg de poids corporel/jour ne provoque aucun effet toxique observable et si l'on ne s'attend à aucune toxicité d'après les résultats obtenus avec des substances de structure voisine, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire d'étudier l'effet d'une dose plus importante. L'essai limite est d'application sauf lorsque des données d'exposition humaine indiquent une nécessité d'utiliser une dose plus forte.

Choix de la dose à utiliser dans l'étude principale

17. Le niveau de dose dans l'étude principale devrait être aussi élevé que possible, compte tenu des résultats de l'étude préliminaire pour le choix des doses et de la limite supérieure de dose fixée à 2 000 mg/kg de poids corporel. Les mortalités éventuelles ne devraient pas affecter la survie d'un nombre suffisant d'animaux pour les analyses biochimiques (six) et pour les observations histologiques au 21^{ème} jour (six). On doit tenter de prévenir la mortalité due à des effets parasymphomimétiques

aigus en recourant à l'atropine ou à tout autre agent protecteur dont on sait qu'il n'interfère pas avec les symptômes neurotoxiques différés.

Observations

18. On doit commencer les observations immédiatement après l'exposition. Toutes les poules doivent être soigneusement observées plusieurs fois par jour au cours des deux premiers jours et ensuite au moins une fois par jour pendant 21 jours ou jusqu'au moment prévu pour le sacrifice. Il faut consigner tous les signes de toxicité avec le moment d'apparition des symptômes, leur type, leur gravité et la durée des comportements anormaux. Pour les observations sur l'ataxie, on doit recourir à une échelle numérique de gravité comportant au moins quatre niveaux et il faut noter les cas de paralysie (12). Au moins deux fois par semaine, les poules choisies pour les études de pathologie doivent être sorties de leur cage et soumises à une période d'activité motrice forcée, comme l'escalade d'échelles, afin de faciliter l'appréciation de faibles manifestations de toxicité. Toute poule moribonde doit être retirée de l'étude, sacrifiée et autopsiée.

Poids corporel

19. Toutes les poules doivent être pesées immédiatement avant l'administration de la substance d'essai et ensuite au moins une fois par semaine.

Biochimie

20. Six poules, choisies au hasard dans chacun des groupes traités et dans le groupe témoin du véhicule, et trois poules, choisies au hasard dans le groupe témoin positif (au cas où un tel groupe fait partie de l'expérience), doivent être sacrifiées quelques jours après l'administration de la dose. Le cerveau et la moelle épinière lombaire de ces animaux doivent être préparés et évalués pour l'activité de la NTE (1)(13)(14)(15). En outre, il peut être utile de préparer et d'évaluer des tissus du nerf sciatique pour l'activité de la NTE (16)(17)(18). Normalement, trois poules du groupe témoin et de chacun des groupes traités sont sacrifiées après 24 heures et trois autres après 48 heures, alors que trois poules du groupe témoin positif doivent être sacrifiées 24 heures après le début de l'expérience. Si l'observation des symptômes cliniques d'intoxication [cette dernière peut souvent être diagnostiquée par l'observation du moment de l'apparition de symptômes parasymphomimétiques (2)] donne à penser que la substance toxique s'élimine très lentement, il peut être préférable de prélever des échantillons de tissus à partir de trois poules, à deux moments au cours d'une période comprise entre 24 et 72 heures après l'administration de la dose.

21. On peut également effectuer des analyses d'acétylcholinestérase (AChE) sur ces échantillons si cela semble opportun (19)(20). Il se peut, toutefois, que l'AChE soit spontanément réactivée *in vivo* et que cela conduise à sous-estimer le potentiel de la substance comme inhibiteur de l'AChE.

Pathologie

Autopsie générale

22. L'autopsie générale de tous les animaux devrait comporter l'observation de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

Histopathologie

23. Des tissus neuraux d'animaux, survivant à la période d'observation et non utilisés pour des études biochimiques, doivent faire l'objet d'examen microscopiques. Les tissus doivent être fixés *in situ* en utilisant des techniques de perfusion. Des coupes doivent être prélevées notamment dans le

cervelet (niveau longitudinal médian), le bulbe rachidien, la moelle épinière et les nerfs périphériques. Les coupes de moelle épinière doivent être prélevées dans la région supérieure du bulbe cervical et dans les régions mésothoracique et sacro-lombaire. Il faut également prélever des coupes dans la région distale du nerf tibial et de ses ramifications au muscle gastrocnémique du nerf sciatique, ainsi que dans le nerf sciatique. Les coupes doivent être colorées avec des colorants adéquats, spécifiques de la myéline et des axones.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

24. Les résultats doivent être donnés individuellement pour chaque animal. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux, montrant pour chaque groupe d'essai le nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux montrant des lésions et des symptômes comportementaux ou biochimiques, les types et gravités de ces lésions et symptômes, ainsi que le pourcentage d'animaux affectés de chaque type et à chaque niveau de gravité de lésion ou effet.

Evaluation des résultats

25. Les résultats de cette étude doivent être évalués en termes d'incidence, de gravité, de corrélation entre les symptômes comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les groupes traités et les groupes témoins.

26. Les résultats numériques doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique adéquate et généralement agréée. Les méthodes statistiques utilisées doivent être choisies pendant le stade de conception de l'étude.

Rapport d'essai

27. Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après:

Substance d'essai:

- nature physique (y compris forme isomère, pureté et propriétés physico-chimiques);
- les caractéristiques permettant de l'identifier.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule lorsqu'il se s'agit pas de l'eau.

Animaux d'expérience:

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

Conditions de l'essai:

- précisions sur la préparation de la substance d'essai, sa stabilité et son homogénéité, le cas échéant;
- précisions sur le mode d'administration de la substance d'essai;

- précisions sur la qualité de la nourriture et de l'eau;
- justification du choix de la dose;
- spécification des doses administrées y compris des précisions sur le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée;
- nature de tout agent protecteur et précisions sur l'administration.

Résultats:

- poids corporel;
- données sur les réactions toxiques par groupe, y compris le taux de mortalité;
- nature, gravité et durée des observations cliniques (préciser si les effets observés sont réversibles ou non);
- description détaillée des méthodes biochimiques utilisées et des résultats;
- résultats de l'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats des examens histopathologiques;
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Discussion des résultats

Conclusions

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Johnson, M.K. (1982). The Target for Initiation of Delayed Neurotoxicity by Organophosphorus Esters: Biochemical Studies and Toxicological Applications. E. Hodgson, J.R. Bend, R.M. Philpot, eds., *Rev. Biochem. Toxicol.*, 4, 141-212.
- (2) Johnson, M.K. (1983). Delayed Neurotoxicity Tests of Organophosphorus Esters: A Proposed Protocol Integrating Neuropathy Target Esterase (NTE) Assays with Behaviour and Histopathology Tests to Obtain More Information More Quickly from Fewer Animals. *Proc. Int. Conf. Envir. Haz. Agrochem. in Devel. Countries, Alexandria, Egypt.* 1, 474-493.
- (3) U.K. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food. Working Document No. 5/5 in Data Requirements for Approval under the Control of Pesticide Regulations. October, 1986.
- (4) IPCS (1990). Principles for the Toxicological Assessment of Pesticide Residues in Food, *Environmental Health Criteria* 104, 61-63.
- (5) OECD (1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity, held in Paris, February 1992.
- (6) OECD (1990). Summary Report of the ad hoc Meeting on Neurotoxicity Testing, held outside Washington, March 1990.
- (7) Davis, C.S., Richardson R.J. (1980). Organophosphorus Compounds. In: *Exper Clin Neurotoxicol*, P.S. Spencer, H.H. Schaumberg, Eds. Williams and Wilkins, Baltimore; 527-544.
- (8) Johnson, M.K., (1975). Organophosphorus Esters Causing Delayed Neurotoxic Effects: Mechanism of Action and Structure/Activity Studies. *Archiv. Toxicol.* 34, 259-288.

- (9) Henschler, D., Schmuch, G., Van Aerssen, M. and Schiffmann, D. (1992). The Inhibitory Effect of Neuropathic Organophosphate Esters on Neurite Outgrowth in Cell Cultures: A Basis for Screening for Delayed Neurotoxicity. *Toxic. in vitro* 6, 327-335.
- (10) Veronesi, B., and Ehrich, M. (1993). Using Neuroblastoma Cell Lines to Evaluate Insecticides Neurotoxicity. *In Vitro Toxicology* 6, 57-65
- (11) Ehrich, M., Correl, L. and Veronesi, B. (1994). Neuropathy Target Esterase Inhibition by Organophosphorus Esters in Human Neuroblastoma Cells. *Neurotoxicology* 15, 309-314.
- (12) Roberts, N.L., Fairley, C., Phillips, C. (1983). Screening Acute Delayed and Subchronic Neurotoxicity Studies in the Hen: Measurements and Evaluations of Clinical Signs Following Administration of TOCP. *Neurotoxicol* 4, 263-270.
- (13) Johnson, M.K. (1977). Improved Assay of Neurotoxic Esterase for Screening Organophosphates for Delayed Neurotoxicity Potential. *Archiv Toxicol.*, 37, 113-115.
- (14) Zech, R., Chemnitz, J.M. (1987). Neurotoxicant Sensitive Esterase: Enzymology and Pathophysiology of Organophosphorus Ester-Induced Delayed Neuropathy. *Prog Neurobiol* 29, 193-218.
- (15) Kayyali, U.S., Moore, T., Randall, J.C., Richardson, R.J. (1991). Neurotoxic Esterase (NTE) Assay: Optimized Conditions Based on Detergent-Induced Shifts in the Phenol/4-aminoantipyrine Chromophore Spectrum. *J. Anal Toxicol* 15, 86-89.
- (16) Carrera, V., Diaz-Alejo, N., Sogorb, J.L., Vicedo, J.L., Vilanova, E. (1994). *In Vivo* Inhibition by Mipafox of Soluble and Particulate Forms of Organophosphorus Neuropathy Target Esterase (NTE) in Hen Sciatic Nerve. *Toxicology Letters* 71, 47-51.
- (17) Moretto, A., Capodicasa, E., Peraica, M. and Lotti, M. (1991). Age Sensitivity to Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy. *Biochemical and Toxicological Studies in Developing Chicks. Biochem. Pharmac.* 41(10), 1497-1504.
- (18) Tormo, N., Gimeno, J.R., Sogorb, M.A., Diaz-Alejo, N. and Vilaanoa, E. (1993). Soluble and Particulate Organophosphorus Neuropathy Target Esterase in Brain and Sciatic Nerve of the Hen, Cat, Rat and Chick. *J. Neurochem.* 61(6), 2164-2168
- (19) Johnson, C.D., Russell, R.L. (1975). A Rapid, Simple, Radiometric Assay for Cholinesterase, Suitable for Multiple Determinations. *Anal. Biochem.* 64, 229-238.
- (20) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Featherstone, R.M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochem., Pharmacol.* 7, 88-95.

ANNEXEDEFINITIONS

La neurotoxicité différée est un syndrome caractérisé par l'apparition différée et prolongée d'ataxie, d'axonopathies distales de la moelle épinière et des nerfs périphériques, ainsi que par l'inhibition et le vieillissement de l'estérase neurotoxique dans le tissu neural.

Les substances organophosphorées comprennent des esters organophosphorés non chargés, des thioesters ou des anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides apparentés phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorthiamidiques, ou toutes autres substances susceptibles de provoquer les effets neurotoxiques quelquefois liés à cette classe de composés.