

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

Adoptée par le Conseil le 27 juillet 1995

Neurotoxicité différée de substances organophosphorées Etude à dose répétée sur 28 jours

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE sont revues périodiquement à la lumière des progrès scientifiques et en prenant en considération le bien-être des animaux. La présente mise à jour de la Ligne directrice 419 fait appel à des méthodes révisées, y compris la mesure de l'inhibition de l'estérase génératrice de neuropathie (précédemment estérase neurotoxique, NTE) pour déterminer les effets de la substance d'essai (1)(2)(3). L'inhibition de la NTE dans le cerveau et dans la moelle épinière, dans un délai de 24 à 48 heures après l'administration de la dose, montre une bonne corrélation avec les symptômes cliniques et morphologiques de neurotoxicité différée. Le modèle d'essai de la NTE a été trouvé applicable à tous les esters organophosphorés dont on sait qu'ils provoquent des neuropathies différées chez l'homme (4). En conséquence, la collecte de données quantitatives relatives à l'inhibition de la NTE améliorera d'une manière significative la possibilité de déterminer si des résultats ambigus observés quelquefois en matière de comportement et d'histopathologie doivent être considérés comme indiquant un potentiel de neurotoxicité différée ainsi que son niveau de concentration sans effet nocif observé (1)(2)(3)(4). Dans la présente mise à jour, la Ligne directrice 419 ne requiert qu'un minimum de 28 jours d'exposition par rapport aux 90 jours d'exposition requis dans la version précédente. En général, ce laps de temps devrait être suffisant pour caractériser le potentiel d'exposition à doses répétées de ces composés organophosphorés (4)(5). Pour de nombreux pesticides, une période de 28 jours peut être plus proche de la durée réelle de l'exposition encourue par les utilisateurs, qu'une période de 90 jours.

2. Cette mise à jour de la Ligne directrice 419 a été élaborée lors d'une réunion consultative d'un groupe de travail ad hoc d'experts en neurotoxicité systémique à court terme (et différée), tenue à Paris en février 1992 (6). Elle est fondée sur une proposition antérieure, débattue lors de la réunion ad hoc sur les essais de neurotoxicité, tenue à Arlington (USA) en mars 1990 (7), et tient compte des observations communiquées par les pays Membres sur cette proposition.

REMARQUES PRELIMINAIRES

3. Cette Ligne directrice est applicable à l'estimation et l'évaluation des effets toxiques de composés organophosphorés (voir Annexe). La détermination de la neurotoxicité différée résultant d'expositions répétées est généralement effectuée après que des essais de toxicité aiguë ont été conduits (Ligne directrice 418). Des informations obtenues au moyen d'essais aigus de neurotoxicité différée et à partir d'autres essais peuvent être utiles dans la conception d'études à dose répétée (8)(9)(10).

4. L'essai de neurotoxicité différée à 28 jours décrit ici fournit des informations sur les possibles dangers pour la santé susceptibles de découler d'expositions répétées pendant un laps de temps limité. Il fournira des informations sur la relation entre dose et effet et pourra donner une estimation de la concentration sans effet nocif observé qui peut servir de base à l'élaboration de critères de sécurité pour l'exposition (4).
5. En fonction du mode d'emploi de certaines substances (les plastifiants, par exemple), il peut s'avérer nécessaire d'envisager des périodes d'exposition plus longues, 90 jours par exemple. Dans certains cas, cependant, des études plus approfondies pourraient être nécessaires pour résoudre les problèmes posés par des données difficiles à interpréter, ou pour définir d'une façon plus précise le mode d'emploi d'une substance donnée.
6. Les définitions de certains termes utilisés sont présentées en Annexe.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des doses de la substance à tester sont administrées quotidiennement par voie orale à des poules domestiques pendant 28 jours. Les animaux sont observés au moins une fois par jour pour déceler d'éventuelles anomalies de comportement, des ataxies et des paralysies. Ces observations sont prolongées pendant 14 jours après la dernière dose administrée. Normalement 24 et 48 heures après l'administration de la dernière dose, on effectue des analyses biochimiques, en particulier de NTE (1)(3), sur des poules choisies au hasard dans chaque groupe. Deux semaines après l'administration de la dernière dose, les animaux survivants sont sacrifiés et on procède à des examens histopathologiques de tissus neuraux choisis.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces animales

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

Conditions d'encagement et d'alimentation

9. 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

10. 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 le groupe témoin.

Voie d'administration et préparation des doses

11. Les doses doivent être administrées par voie orale quotidiennement, 7 jours par semaine, de préférence par gavage ou par l'intermédiaire de gélules de gélatine. Les substances liquides peuvent être administrées à l'état pur ou être dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs. Dans toute la mesure du possible, les substances solides doivent être dissoutes, étant donné que des doses importantes de matières solides encloses dans des gélules de gélatine peuvent échapper en partie à l'absorption. Si 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

12. Chaque groupe doit contenir un nombre de poules suffisant pour que six d'entre elles puissent être sacrifiées pour les examens biochimiques (deux groupes de trois à des moments différents) et pour que six soient encore en vie après la période d'observation de 14 jours qui suit le traitement.

13. En règle générale, il faut utiliser au moins trois groupes de traitement et un groupe témoin du véhicule, mais si d'après les résultats d'autres études [étude à dose unique de la Ligne directrice 418, ou essais de dépistage *in vitro* (10)(11)(12) ou encore des relations structure-activité (8)(9), par exemple], on ne s'attend pas à des effets à la suite de l'administration d'une dose de 1000 mg/kg de poids corporel/jour, on peut procéder à un essai limite.

14. Le groupe témoin du véhicule et chaque groupe de traitement doivent contenir chacun au moins six poules pour les analyses biochimiques et six poules pour les examens pathologiques. Le groupe témoin du véhicule doit être traité de la même manière que les groupes de traitement, mise à part l'administration de la substance.

Choix des doses

15. Les niveaux de dose doivent être choisis en fonction des résultats d'un essai aigu de neurotoxicité différée (Ligne directrice 418 par exemple) et de toute autre donnée toxicologique ou toxico-cinétique disponible. Le niveau de dose le plus élevé doit être choisi de façon à provoquer des effets toxiques, de préférence des effets neurotoxiques différés, mais sans engendrer la mort ni des souffrances manifestes. A partir de là, les niveaux de dose iront en ordre décroissant de façon à mettre en évidence toute relation entre dose et effet et l'absence d'effets nocifs observables au niveau de dose le plus faible.

Essai limite

16. Si un essai effectué suivant la méthode décrite dans la présente Ligne directrice avec une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ne provoque aucun effet toxique observable et si on ne s'attend à aucune toxicité d'après des données sur des substances de structure voisine, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire d'étudier l'effet d'une dose plus élevée. L'essai limite s'applique sauf lorsque des données d'exposition humaine indiquent une nécessité d'utiliser une dose plus forte.

Observations

17. On doit commencer les observations immédiatement après le début de l'administration. Toutes les poules doivent être soigneusement observées au moins une fois par jour au cours des 28 jours de traitement et pendant la période d'observation de 14 jours après la fin de l'administration des doses ou

jusqu'au jour choisi pour le sacrifice. Il faut consigner tous les symptômes de toxicité en mentionnant le moment de leur début, leur type, leur gravité et leur durée. Les observations doivent inclure les anomalies de comportement mais ne pas se limiter à celles-ci. Pour exprimer le niveau d'ataxie, il faut se référer à une échelle de gravité comportant au moins quatre niveaux et les cas de paralysie doivent être consignés (13). Au moins deux fois par semaine, il faut sortir les poules des cages et les soumettre à une période d'activité motrice forcée, telle que l'escalade d'une échelle, afin de faciliter l'appréciation de faibles manifestations de toxicité. Toute poule moribonde doit être retirée de l'étude, sacrifiée et autopsiée.

Poids corporel

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

Biochimie

19. Six poules choisies au hasard dans chacun des groupes traités et dans le groupe témoin du véhicule doivent être sacrifiées quelques jours après l'administration de la dernière dose. Il faut préparer le cerveau et la moelle épinière lombaire et mesurer l'activité de la NTE (1)(14)(15)(16). Normalement, trois poules du groupe témoin et de chacun des groupes traités sont sacrifiées 24 heures après l'administration de la dernière dose et trois autres 48 heures après l'administration de la dernière dose. On peut choisir d'autres délais si les résultats de l'étude de toxicité aiguë (Ligne directrice 418) ou d'autres études (toxicocinétique par exemple) donnent à penser qu'il vaut mieux procéder aux sacrifices à d'autres moments après l'administration de la dernière dose.

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

Pathologie

Autopsie générale

21. L'autopsie générale de tous les animaux (que leur sacrifice soit prévu dans le mode opératoire ou rendu nécessaire par leur état moribond) doit comporter l'observation de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

Histopathologie

22. Les tissus neuraux d'animaux survivant à la période d'observation, 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 (coupe longitudinale du milieu), 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 et du nerf sciatique. Les coupes doivent être colorées avec des colorants adéquats, spécifiques de la myéline et des axones. Pour commencer, les examens microscopiques doivent être effectués sur les tissus conservés de tous les animaux du groupe témoin et du groupe ayant reçu la dose la plus élevée. Lorsque des effets sont mis en évidence dans le groupe qui a reçu la dose la plus élevée, il faut également effectuer des examens microscopiques sur les tissus des poules appartenant aux groupes à dose intermédiaire et faible.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

23. 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

24. 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.

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

Rapport d'essai

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

Substance d'essai:

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

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule lorsqu'il ne 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 des doses;
- spécification des doses administrées y compris des précisions sur le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée;

Résultats:

- poids corporel;

- effets de toxicité par groupe, y compris le taux de mortalité;
- niveau sans effet nocif observé;
- 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

BIBLIOGRAPHIE

- (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) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. *Environmental Health Criteria* 60.
- (6) 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.
- (7) OECD (1990). Summary Report of the ad hoc Meeting on Neurotoxicity Testing held outside Washington, March 1990.
- (8) 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.
- (9) Johnson, M.K. (1975). Organophosphorus esters causing delayed neurotoxic effects: Mechanism of action and structure/activity studies. *Archiv. Toxicol.* 34, 259-288.
- (10) Henschler, D., Schmuck, G., Van Aerssen, M. and Schiffmann, D. (1992). The Inhibitory Effect of Neurotoxic Organophosphate Esters on Neurite Outgrowth in Cell Cultures: A Basis for Screening for Delayed Neurotoxicity. *Toxic. in vitro* 6, 327-335.
- (11) Veronesi, B. and Ehrlich, M. (1993). Using neuroblastoma cell lines to evaluate insecticides neurotoxicity. *In Vitro Toxicology* 6: 57-65

- (12) Ehrich, M., Correl, L. and Veronesi, B. (1994). Neuropathy target esterase inhibition by organophosphorus esters in human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 15, 309-314.
- (13) 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.
- (14) Johnson, M.K. (1977). Improved Assay of Neurotoxic Esterase for Screening Organophosphates for Delayed Neurotoxicity Potential. *Archiv Toxicol.*, 37, 113-115.
- (15) Zech, R., Chemnitz, J.M. (1987). Neurotoxicant sensitive esterase: Enzymology and pathophysiology of organophosphorus ester-induced delayed neuropathy. *Prog Neurobiol* 29, 193-218.
- (16) 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.
- (17) 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
- (18) 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
- (19) Tormo, N., Gimeno, J.R., Sogorb, M.A., Diaz-Alejo, N. and Vilanova, 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
- (20) Johnson, C.D., Russell, R.L. (1975). A rapid, simple, radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal. Biochem.* 64, 229-238.
- (21) 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.