

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

### **Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée**

#### **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 ou des changements dans les pratiques d'évaluation. La Ligne directrice 420 d'origine a été adoptée en juillet 1992 comme première méthode alternative pour l'essai de toxicité aiguë conventionnel décrit dans la Ligne directrice 401. Suite aux recommandations de plusieurs réunions d'experts, la révision était opportune car i) un accord international sur les valeurs limites harmonisées des DL50 utilisées dans la classification de substances chimiques avait été réalisé, ces valeurs étant différentes de celles préconisées dans la version de 1992 de la Ligne directrice, et ii) il est maintenant jugé suffisant d'effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, généralement des femelles.

2. Les méthodes traditionnelles pour évaluer la toxicité aiguë utilisent comme effet observé la mort des animaux. En 1984, la British Toxicology Society (BTS) a proposé une nouvelle approche pour les essais de toxicité aiguë utilisant des doses prédéterminées (1). Cette méthode évitait d'utiliser la mort des animaux comme effet observé et s'appuyait plutôt sur l'observation de signes manifestes de toxicité apparaissant après traitement à une dose prédéterminée. Suite à des études de validation *in vivo* au Royaume-Uni (2) et au niveau international (3), cette procédure a été adoptée par le Conseil comme Ligne directrice en 1992. Après cela, les propriétés statistiques de la Méthode de la dose prédéterminée ont été évaluées dans une série d'études utilisant des modèles mathématiques (4)(5)(6). Ensemble, les études *in vivo* et celles basées sur des modèles mathématiques ont démontré que la procédure est reproductible et utilise moins d'animaux, tout en occasionnant moins de souffrance, que les méthodes traditionnelles. Comparée aux autres méthodes d'essai de toxicité aiguë (Lignes directrices 423 et 425), cette méthode permet de classer des substances par ordre de toxicité de façon similaire.

3. Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (7). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la Ligne directrice 420.

4. On trouvera à l'Annexe 1 les définitions des termes utilisés dans cette Ligne directrice.

#### **CONSIDÉRATIONS INITIALES**

5. La méthode de la dose prédéterminée a comme principe de n'utiliser, pour l'étude principale, que des doses modérément toxiques et d'éviter d'administrer des doses qui peuvent s'avérer létales. De même, il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, on doit tuer avec humanité les animaux moribonds et les animaux qui souffrent de façon manifeste ou qui montrent des signes de détresse grave. Ces animaux doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider de tuer les animaux

moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente fassent l'objet d'un autre document d'orientation (8).

6. La méthode fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement des substances dans le Système de classification globalement harmonisé (SGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë (9).

7. Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations contiendront l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo*, les données toxicologiques de substances structurellement apparentées et l'usage escompté de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

8. Des groupes d'animaux d'un seul sexe reçoivent des doses prédéterminées de 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg selon une procédure séquentielle. Exceptionnellement une dose additionnelle de 5000 mg/kg peut être envisagée (voir paragraphe 19). La dose initiale est choisie sur la base d'une étude d'orientation comme celle qui est susceptible de provoquer des effets toxiques, toutefois sans causer des effets toxiques sévères ou la mort. Les manifestations cliniques et les effets associés à la douleur, la souffrance et une mort imminente sont décrites dans un Document d'orientation de l'OCDE (8). D'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou moins fortes en fonction de l'absence ou de la présence d'effets toxiques ou de mortalité. On continue la procédure jusqu'à ce que l'on identifie la dose qui occasionne un effet toxique évident ou la mort d'un seul animal. La procédure est également interrompue lorsque la dose la plus forte ne donne lieu à aucun effet observé ou que la dose la plus faible ne donne aucune mortalité.

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

#### **Choix de l'espèce animale**

9. Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Normalement on utilise des femelles (7). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL50 permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont généralement légèrement plus sensibles (10). Cependant, si la connaissance des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins indique que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas il faut fournir une justification adéquate.

10. Il faut prendre des animaux adultes sains provenant de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer à un intervalle de  $\pm 20\%$  par rapport au poids moyen des animaux précédemment exposés.

#### **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

11. La température du local des animaux 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. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour

l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

### **Préparation des animaux**

12. Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

### **Préparation des doses**

13. En général, la substance d'essai doit être administrée à volume constant pour toute la gamme de doses en variant la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de dette substance. Certaines autorités réglementaires le veulent ainsi. Dans aucun cas, le volume de dose maximal ne peut être dépassé. Le volume maximal de liquide qui peut être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Pour les rongeurs, le volume ne doit pas dépasser 1 mL/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 mL/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

## **MODE OPERATOIRE**

### **Administration des doses**

14. La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

15. Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance ; pour les rats on supprime la nourriture, mais pas l'eau, pendant la nuit et pour les souris on supprime la nourriture, mais pas l'eau, pendant 3 à 4 heures. Après la période de jeune, les animaux doivent être pesés et puis la substance d'essai leur est administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

### **Étude d'orientation**

16. Le but de l'étude d'orientation est de permettre de choisir la dose initiale appropriée pour l'étude principale. L'administration des doses se fait de façon séquentielle à des animaux uniques selon les schémas de l'Annexe 2. L'étude d'orientation prend fin lorsqu'une décision au sujet de la dose initiale de l'étude principale peut être prise (ou si une mortalité est observée à la dose prédéterminée la plus faible).

17. Pour la dose initiale de l'étude d'orientation on choisit un niveau parmi les suivants : 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer des signes de toxicité évidente, si possible sur la base d'indications obtenues à partir de données *in vivo* et *in vitro* sur la même

substance et sur des substances structurellement voisines. En l'absence de telles informations, la dose initiale sera de 300 mg/kg.

18. Entre l'administration de doses à des animaux successifs on laisse un délai de 24 heures au moins. Tous les animaux sont observés pendant au moins quatorze jours.

19. Exceptionnellement, et lorsque cela est justifié pour répondre à une exigence découlant d'un besoin spécial d'une réglementation, on peut prendre en considération d'utiliser une dose prédéterminée maximale de 5000 mg/kg (voir l'Annexe 4). L'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2000-5000 mg/kg) doit être découragé pour des raisons de protection des animaux. Un tel essai est seulement envisageable lorsqu'il y a une forte probabilité que les résultats seront des éléments importants pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

20. Dans le cas où un animal ayant reçu la dose prédéterminée la plus faible (5 mg/kg) mourrait au cours de l'étude d'orientation, le processus normal est de terminer l'étude et de classer la substance en catégorie 1 du SGH (voir l'Annexe 2). Cependant, il peut être nécessaire de confirmer la classification et un processus supplémentaire, décrit ci-après, est alors une option. Un deuxième animal reçoit une dose de 5mg/kg. Si cet animal meurt, la classification en catégorie 1 du SGH est confirmée et l'étude prend fin immédiatement. Si le deuxième animal survit, un maximum de trois animaux supplémentaires reçoivent chacun 5 mg/kg. Parce que le risque de mortalité est très grand et pour protéger les animaux le plus possible il faut faire l'administration de façon séquentielle. L'intervalle de temps entre chaque administration doit être suffisant afin de pouvoir démontrer que l'animal précédent a des chances de survivre. Si une deuxième mort d'animal intervient, l'administration séquentielle sera immédiatement arrêtée et aucun autre animal ne recevra de dose. Avec une deuxième mort d'animal (peu importe le nombre d'animaux qui ont été soumis à l'essai au moment de la terminaison de l'étude d'orientation), le résultat est A (2 morts ou plus) et ceci mène à une classification selon l'Annexe 3 pour la dose prédéterminée de 5mg/kg : catégorie 1 s'il y a 2 ou plus de morts et catégorie 2 s'il y a seulement 1 mort.

## **Étude principale**

### **Nombre d'animaux et niveaux des doses**

21. Les schémas de l'Annexe 3 indiquent quelle action il s'agit d'entreprendre après l'essai avec la dose initiale. Il faut choisir entre trois étapes possibles: arrêter l'essai et attribuer la classification appropriée, administrer la dose prédéterminée supérieure ou administrer la dose inférieure. Il ne faut pas répéter un niveau de dose qui a causé la mort au cours de l'étude d'orientation afin de ne pas nuire au bien-être des animaux. (voir Annexe 3). L'expérience acquise a démontré que le résultat le plus probable est que la substance peut être classée à partir de la réponse obtenue avec le niveau de dose initial et qu'il est inutile de prolonger l'essai.

22. Normalement, un total de cinq animaux est utilisé à chaque niveau de dose étudié. Dans ces cinq animaux sont inclus l'animal qui a reçu dans l'étude d'orientation la dose sélectionnée et quatre animaux supplémentaires (excepté le cas inhabituel quand la dose utilisée dans l'étude principale n'a pas été incluse dans l'étude d'orientation).

23. L'intervalle de temps entre l'administration de chaque niveau de dose est dicté par le moment du début, la durée et la sévérité des effets toxiques observés. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Un laps de temps de 3 ou 4 jours entre administrations à chaque niveau de dose est recommandé, quand cela est nécessaire, afin d'observer des effets de toxicité différée. L'intervalle peut être ajusté comme il convient, par exemple dans le cas d'une réponse peu concluante.

24. Lorsqu'une dose prédéterminée maximale de 5000 mg/kg est envisagée il faut suivre le processus explicité en Annexe 4 (voir également le paragraphe 9).

### **Essai limite**

25. L'essai limite est utilisé principalement lorsque des informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique sont disponibles, c.à.d. que la toxicité se situe au-dessus de la dose limite réglementaire. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être recueillies à partir de connaissances de substances, produits ou mélanges similaires déjà soumis à essai, prenant en compte l'identité et le pourcentage des composants connus pour avoir une importance du point de vue toxicologique. Quand on ne dispose d'aucune ou de peu d'informations concernant la toxicité, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut exécuter l'essai principal.

26. En utilisant la marche normale à suivre, une étude d'orientation avec une dose initiale de 2000 mg/kg (exceptionnellement 5000 mg/kg) suivie du traitement de quatre animaux supplémentaires à ce même niveau sert d'essai limite dans cette Ligne directrice.

### **OBSERVATIONS**

27. Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement. Une attention particulière s'impose pendant les premières 4 heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance, à l'exception des animaux qui sont morts au cours de l'étude ou qui sont retirés de l'étude et tués avec humanité pour des raisons de protection des animaux. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée d'une manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération. Elle peut par conséquent être prolongée, si nécessaire. Les moments où apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, particulièrement quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes (11) Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

28. D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le Document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (8). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être tués pour des raisons humanitaires. Quand les animaux sont tués pour des raisons humanitaires ou si on les trouve morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

### **Poids corporel**

29. Le poids individuel de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et ensuite au moins une fois par semaine. Les changements de poids doivent être calculés et enregistrés. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis tués avec humanité.

### **Pathologie**

30. Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons de protection des animaux) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle

macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car cet examen peut fournir des renseignements utiles.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Résultats**

31. Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant pour chaque groupe d'essai le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou tués pour des raisons humanitaires, pour chaque animal le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité et les résultats de l'autopsie.

### **Rapport d'essai**

32. Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris les isomères);
- données relatives à l'identification, numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule, lorsque celui-ci n'est pas de l'eau.

Animaux d'essai :

- espèce/souche utilisées;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu;
- nombre, âge et sexe des animaux (la justification de l'utilisation de mâles à la place de femelles, le cas échéant ;
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc. ;

Conditions de l'essai:

- formulation détaillée de la substance d'essai, y compris l'état physique du produit administré;
- détails sur le mode d'administration, volume des doses et moment de l'administration;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance et celle de l'eau);
- la justification du choix de la dose initiale.

## Résultats:

- tableau des résultats et niveau de dose pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de la mortalité, nature, gravité et durée des effets);
- tableau des poids corporels et changements de poids;
- poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite par intervalles d'une semaine, et au moment de la mort ou du sacrifice;
- date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le sacrifice;
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité;
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et toutes les observations histo-pathologiques.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469-482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323.
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2000). Statistical evaluation of modifications to the fixed dose procedure (manuscript in preparation).
- (7) OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.
- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2,

p.11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].

- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.
- (11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation in: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A.W. Hayes , Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Il y a toxicité orale aiguë si des effets défavorables apparaissent après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt, ni apparaît moribond, en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

La dose est la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg).

Toxicité manifeste est un terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai [voir (3) pour des exemples]. Ces signes doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de douleurs importantes et des signes persistants de détresse profonde, un état moribond [pour les critères voir (8)] et probablement de la mortalité pour la plupart des animaux.

SGH: Système de classification globalement harmonisé. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du Comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du B.I.T (communication des dangers) et coordonnée par IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort intervienne avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [pour de plus amples détails voir (8)].

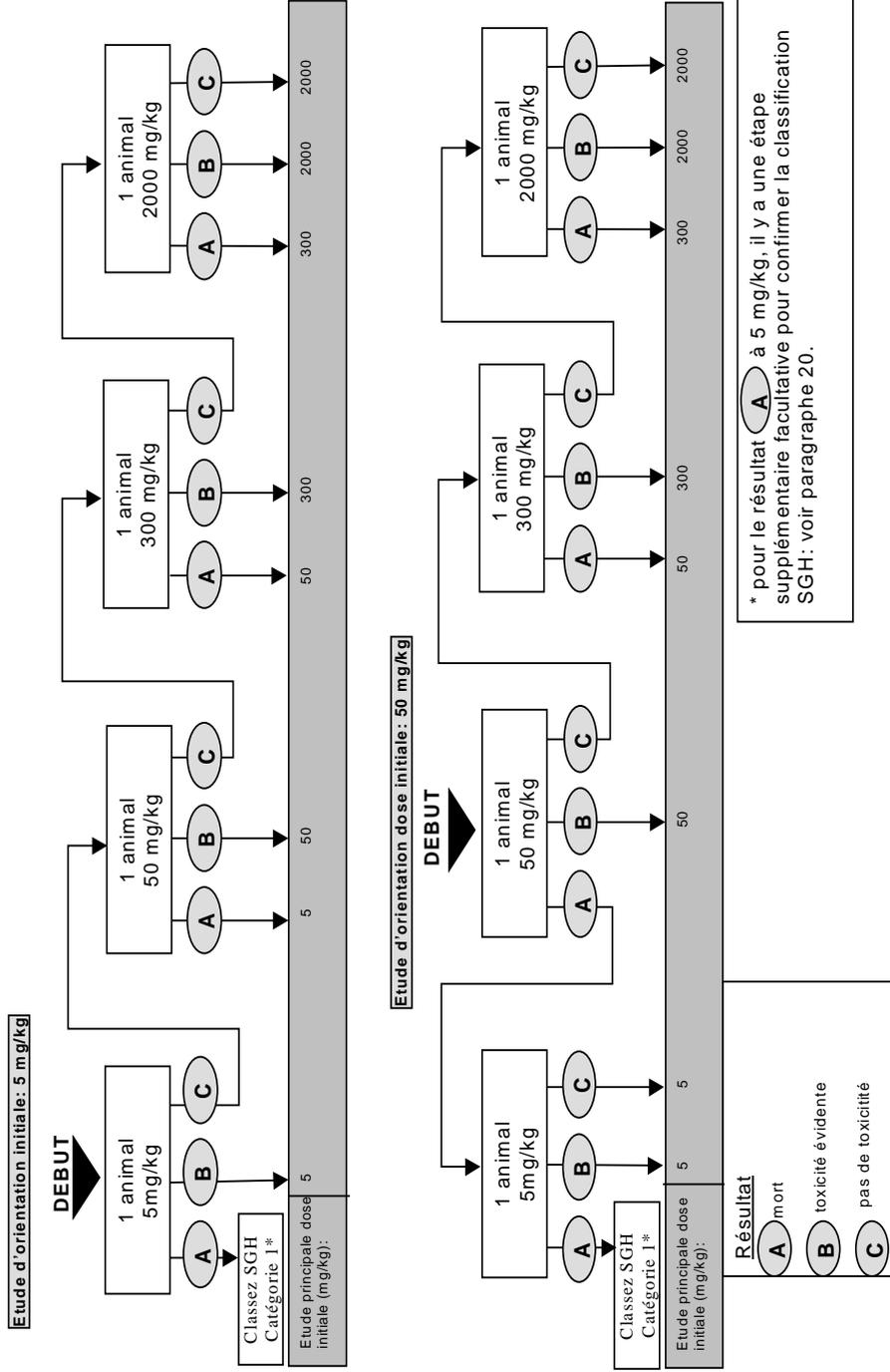
DL50 (dose létale 50%) par voie orale: dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL50 est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite réfère à une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2000 ou 5000 mg/kg).

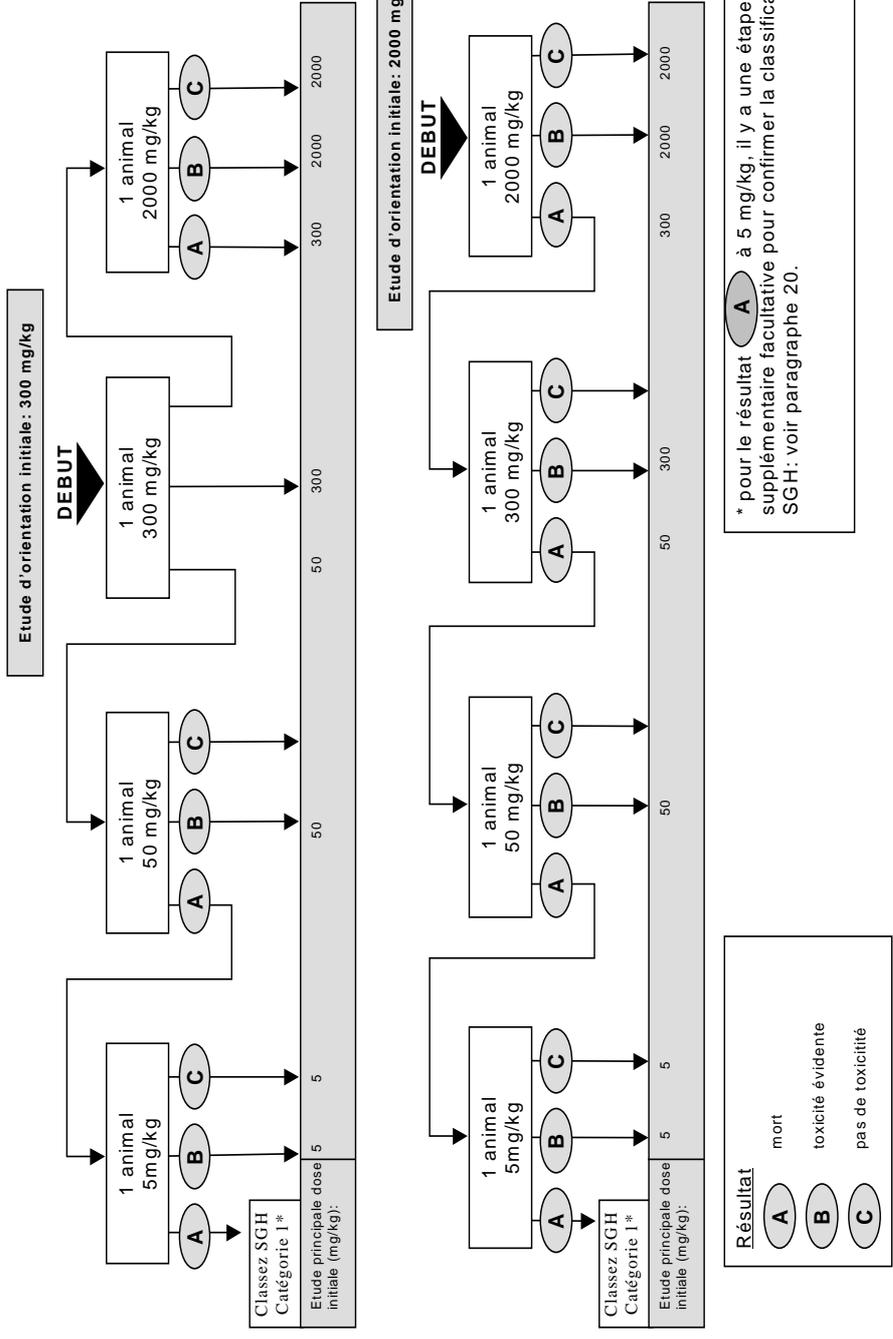
État moribond: l'état avant la mort ou l'incapacité de survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails voir (8)].

Mort prévisible: la présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment futur connu avant la fin projetée de l'expérience, par exemple l'incapacité d'atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails voir (8)].

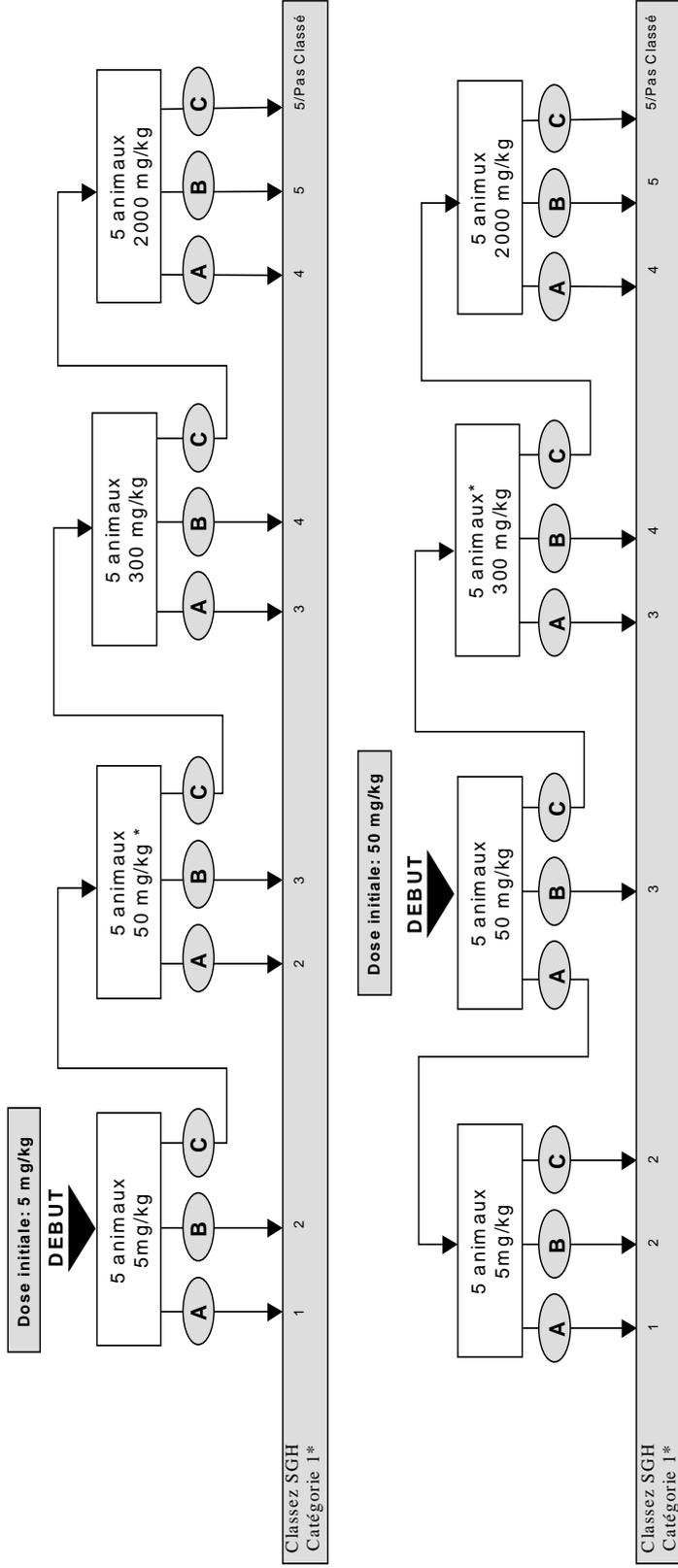
ANNEXE 2: SCHEMA POUR L'ETUDE D'ORIENTATION



ANNEXE 2: SCHEMA POUR L'ETUDE D'ORIENTATION



ANNEXE 3: SCHEMA POUR L'ETUDE PRINCIPALE



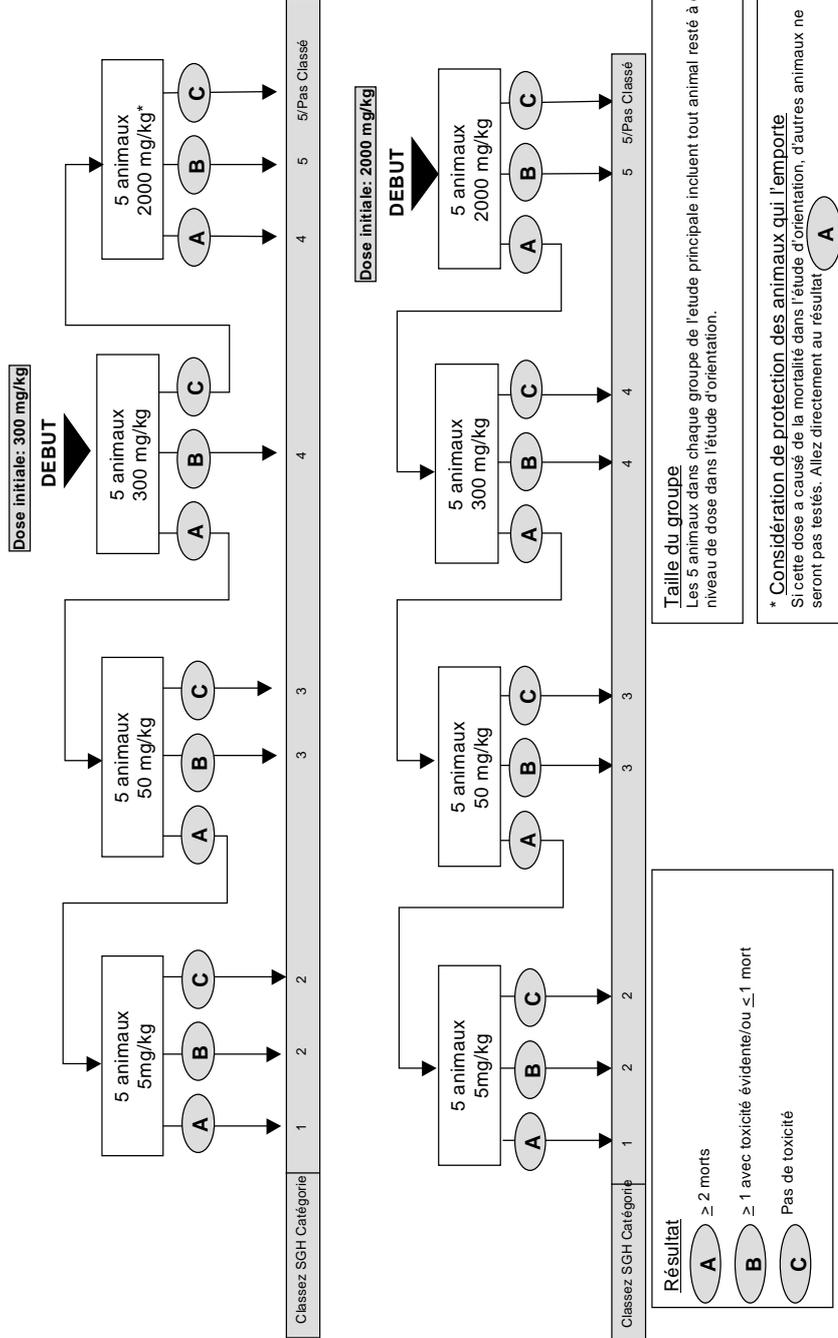
**Taille du groupe**  
 Les 5 animaux dans chaque groupe de l'étude principale incluent tout animal resté à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation.

**\* Considération de protection des animaux qui l'emporte**  
 Si cette dose a causé de la mortalité dans l'étude d'orientation, d'autres animaux ne seront pas testés. Allez directement au résultat **A**

**Résultat**

- A** ≥ 2 morts
- B** ≥ 1 avec toxicité évidente/ou ≤ 1 mort
- C** Pas de toxicité

ANNEXE 3: SCHEMA POUR L'ETUDE PRINCIPALE



**ANNEXE 4****CRITÈRES POUR CLASSER DES SUBSTANCES D'ESSAI AVEC UNE DL50 ATTENDUE SUPÉRIEURE À 2000 MG/KG SANS AVOIR RECOURS À L'ESSAI**

1. Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à l'identification de substances dont la toxicité aiguë est relativement faible mais qui peuvent, sous certaines conditions, être dangereuses pour des populations vulnérables. La DL50 orale ou dermale de ces substances est escomptée se situer dans la gamme 2000-5000 mg/kg ou de doses équivalentes par d'autres routes. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SCGH de danger 5, définie par  $2000 \text{ mg/kg} < \text{DL50} < 5000 \text{ mg/kg}$ , dans les cas suivants:

- a) si, sur la base de l'incidence de mortalité, l'un quelconque des schémas de l'Annexe 3 dirige la substance vers cette catégorie;
- b) si l'on possède des indications fiables que la DL50 se situera dans la gamme de la catégorie 5; ou si d'autres études sur des animaux ou des observations d'effets toxiques constatés chez l'homme suscitent des inquiétudes motivées pour la santé humaine;
- c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, si la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée et
  - l'on possède des informations fiables indiquant des effets toxiques significatifs pour l'homme, ou
  - de la mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
  - lorsqu'un jugement d'expert confirme des signes cliniques significatifs de toxicité dans un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis la diarrhée, les modifications des poils ou un aspect mal soigné, ou
  - quand un jugement d'expert confirme des informations fiables indiquant des effets aigus potentiellement significatifs sur la base des autres études sur animaux.

**DES ESSAIS À DES DOSES SUPÉRIEURES À 2000 MG/KG**

2. Exceptionnellement, et lorsque cela est justifié pour répondre à une exigence découlant d'un besoin spécial d'une réglementation, on peut prendre en considération d'utiliser une dose prédéterminée maximale de 5000 mg/kg. Pour des raisons liées à la protection du bien-être des animaux, l'essai de substances à 5000 mg/kg doit être découragé. Il est seulement envisageable lorsqu'il y a une forte probabilité que les résultats d'un tel essai seront des éléments importants pour la protection de la santé des hommes et des animaux (9).

**Étude d'orientation**

3. Les critères de décision du processus séquentiel présenté en Annexe 2 sont étendus jusqu'à inclure un niveau de 5000 mg/kg. Lorsqu'une dose initiale de 5000 mg/kg est utilisée dans l'étude d'orientation et que le résultat A (mortalité) est obtenu il faut tester un deuxième animal à 2000 mg/kg; si le premier résultat est B ou C (toxicité évidente ou pas de toxicité) il est permis de choisir 5000 mg/kg comme dose initiale de l'étude principale. Si une dose initiale différente de 5000 mg/kg est choisie, l'essai progressera au niveau 5000mg/kg dans les cas d'un résultat B ou C à 2000 mg/kg. Un résultat postérieur A à 5000mg/kg imposera la dose initiale de 2000 mg/kg pour l'étude principale et les résultats B et C imposeront la dose initiale de 5000 mg/kg pour l'étude principale.

**Étude principale**

4. Les critères de décision du processus séquentiel présenté en Annexe 3 sont étendus jusqu'à inclure un niveau de 5000 mg/kg. Lorsqu'une dose initiale de 5000 mg/kg est utilisée dans l'étude principale et que le résultat A (> 2 morts) est obtenu il faut tester un deuxième groupe à 2000 mg/kg. Si le premier résultat est B (toxicité évidente et/ou < 1 mort) ou C (pas de toxicité), la substance ne sera pas classée dans le cadre du SCGH. De façon similaire, si une dose initiale différente de 5000 mg/kg est choisie, l'essai progressera au niveau 5000mg/kg dans le cas d'un résultat C à 2000 mg/kg. Un résultat postérieur A à 5000mg/kg imposera la classification de la substance dans la catégorie SCGH 5 et les résultats B ou C feront que la substance ne sera pas classée dans le cadre du SCGH.