

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

Bio-essai de Hershberger sur le rat : Essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques

INTRODUCTION

1. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire dans le dessein de réviser les Lignes directrices existantes et d'établir de nouvelles Lignes directrices relatives au dépistage et à l'essai des substances susceptibles de perturber le système endocrinien (1). L'une des composantes de cette activité concernait le développement d'une Ligne directrice pour le bio-essai de Hershberger sur le rat. Après plusieurs décennies d'utilisation par l'industrie pharmaceutique, cet essai a été pour la première fois normalisé par un comité d'experts officiels en 1962 comme outil de dépistage de produits chimiques androgéniques (2). Entre 2001 et 2007, le bio-essai de Hershberger sur le rat a fait l'objet d'un programme de validation approfondi, comprenant notamment la constitution d'un document d'examen détaillé (23), la compilation d'un article détaillé sur les méthodes (3), l'élaboration d'un guide de dissection (21) et la mise en œuvre d'études intra- et inter-laboratoires poussées visant à démontrer la fiabilité et la reproductibilité du bio-essai. Ces études de validation ont été menées à l'aide d'un androgène de référence fortement actif (propionate de testostérone (TP), de deux androgènes synthétiques fortement actifs (acétate de trenbolone et méthyltestostérone), d'un produit pharmaceutique antiandrogénique fortement actif (flutamide), d'un inhibiteur fortement actif (finastéride) de la synthèse de l'androgène naturel (dihydrotestostérone-DHT), de plusieurs pesticides faiblement antiandrogéniques (linuron, vinclozoline, procymidone, p,p' DDE), d'un inhibiteur de 5 α -réductase fortement actif (finastéride) et de deux produits chimiques négatifs connus (dinitrophénol et nonylphénol) (4) (5) (6) (7) (8). Cette Ligne directrice pour les essais résulte de la longue expérience acquise par l'utilisation du bio-essai et de l'expérience acquise au cours programme de validation et des résultats obtenus.

2. Le bio-essai de Hershberger est un essai de dépistage *in vivo* à court terme qui emploie des tissus accessoires de l'appareil reproducteur mâle. L'essai date des années 30 et il a été modifié dans les années 40 par l'inclusion de muscles de l'appareil reproducteur mâle qui répondent aux androgènes (2) (9-15). Au cours des années 60, plus de 700 androgènes putatifs ont été évalués à l'aide d'une version normalisée du mode opératoire (2) (14), et l'utilisation de l'essai a été considérée comme une méthode standard aussi bien pour les androgènes que pour les antiandrogènes pendant les années 60 (2) (15). L'essai biologique actuel est fondé sur les variations de poids de cinq tissus dépendant des androgènes chez le rat mâle péripubertaire castré. Il évalue la capacité d'un produit chimique à induire des activités biologiques analogues à celles induites par des agonistes et des antagonistes d'androgènes ou des inhibiteurs de 5 α -réductase. Les cinq tissus cibles dépendant des androgènes inclus dans cette Ligne directrice pour les essais sont la prostate ventrale (PV), la vésicule séminale (VS) (plus les fluides et les glandes coagulantes), les muscles élévateur de l'anus et bulbocaverneux (EABC), la paire de glandes de Cowper (COW) et le gland (G). Chez le rat mâle péripubertaire castré, ces cinq tissus répondent tous

© OCDE, (2009).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

aux androgènes par une augmentation du poids absolu. Lorsqu'ils sont stimulés en vue d'augmenter leur poids par l'administration d'un androgène de référence fortement actif, ces cinq tissus répondent tous aux antiandrogènes par une diminution du poids absolu. Le premier modèle du bio-essai de Hershberger est le mâle péripubertaire chirurgicalement castré, et il a été validé dans les phases 1, 2 et 3 du programme de validation de Hershberger.

3. Le bio-essai de Hershberger est utilisé comme un test de dépistage mécanistique *in vivo* des agonistes d'androgènes, des antagonistes d'androgènes et des inhibiteurs de 5 α -réductase, et son application est envisagée dans le contexte du « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens » (Annexe 2). Dans ce cadre conceptuel, le bio-essai de Hershberger se situe au niveau 3 en tant qu'essai *in vivo* fournissant des données sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir l'(anti)androgénicité. Il est destiné à faire partie d'une batterie d'essais *in vitro* et *in vivo* permettant d'identifier les substances susceptibles d'interagir avec le système endocrinien, et, à terme, d'évaluer les risques et les dangers pour la santé humaine ou l'environnement.

4. Compte tenu des problèmes de bien être des animaux posés par la castration, le male sevré stimulé intact (non castré) a été étudié comme model alternatif pour l'essai Hershberger afin d'éviter l'étape de castration. La méthode d'essai utilisant le male sevré stimulé a été validée (24). Cependant, dans les études de validation, le modèle adulte sevré de l'essai Hershberger n'a pas montré sa capacité à détecter de façon régulière les effets de substances à faible activité anti-androgène sur le poids d'organes dépendant des androgènes, aux doses testées. C'est la raison pour laquelle ce modèle n'a pas été inclus dans cette Ligne directrice. Toutefois, considérant que son utilisation peut avoir non seulement des avantages en termes de bien être des animaux, mais peut aussi fournir des informations sur d'autres modes d'action, il est disponible dans le Document d'orientation N° 115.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

5. Les agonistes et les antagonistes d'androgènes agissent comme des ligands du récepteur d'androgène et peuvent activer ou inhiber, respectivement, la transcription des gènes contrôlée par le récepteur. De surcroît, certaines substances chimiques inhibent la conversion de la testostérone en androgène dihydrotestostérone naturel plus actif dans certains tissus cibles des androgènes (inhibiteurs de 5 α -réductase). Ces substances peuvent avoir des effets néfastes pour la santé, y compris des effets sur la reproduction et le développement. Par conséquent, il est nécessaire, dans des objectifs de réglementation, d'estimer et d'évaluer rapidement les potentialités d'agoniste ou d'antagoniste des androgènes ou d'inhibiteur de 5 α -réductase d'un produit chimique. Même si leur valeur informative est appréciable, l'affinité d'un ligand pour un récepteur d'androgène telle que mesurée par sa liaison au récepteur ou par l'activation de la transcription de gènes reporters *in vitro* n'est pas le seul déterminant d'un danger éventuel. D'autres facteurs critiques sont l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution des substances entre les tissus cibles, et l'élimination de l'organisme. Il est par conséquent nécessaire de détecter l'activité éventuelle d'un produit chimique *in vivo* dans des conditions opératoires et d'exposition appropriées. L'évaluation *in vivo* est moins cruciale si les caractéristiques ADME (absorption – distribution – métabolisme – élimination) de la substance chimique sont connues. Les tissus dépendant des androgènes répondent par une croissance rapide et vigoureuse à une stimulation par des androgènes, notamment chez les rats mâles péripubertaires castrés. Les rongeurs, en particulier le rat, sont aussi largement utilisés dans les études de toxicité visant à caractériser les dangers. Par conséquent, la version de l'essai qui emploie le rat péripubertaire castré et les cinq tissus cibles convient au dépistage *in vivo* d'agonistes et d'antagonistes des androgènes et d'inhibiteurs de 5 α -réductase.

6. La présente Ligne directrice est fondée sur les protocoles employés dans l'étude de validation de

l'OCDE qui se sont révélés fiables et reproductibles dans les analyses intra- et interlaboratoires (4) (5) (6) (7) (8). Dans cette Ligne directrice, sont présentés des protocoles pour les androgènes et les antiandrogènes.

7. La dose de TP utilisée pour détecter les antiandrogènes dans le programme de validation du bio-essai de Hershberger de l'OCDE variait légèrement selon les différents laboratoires (0.2 versus 0.4 mg/kg/j par injection sous-cutanée), mais la capacité à détecter une activité antiandrogénique faible ou forte présentait peu de différence entre ces deux variantes du mode opératoire. De toute évidence, il ne faut pas utiliser une dose de TP trop élevée qui bloquerait les effets des antagonistes de récepteurs d'androgènes (RA) faibles, ni une dose trop faible, car les tissus androgéniques ne présenteraient alors qu'une réponse de croissance limitée même sans coadministration d'antiandrogène.

8. La réponse de croissance des tissus dépendant des androgènes individuels n'est pas entièrement d'origine androgénique, des composés qui ne sont pas des agonistes d'androgènes pouvant modifier le poids de certains tissus. Toutefois, la réponse de croissance simultanée de plusieurs tissus corrobore l'hypothèse d'un mécanisme plus spécifique des androgènes. Par exemple, des doses élevées d'œstrogènes fortement actifs peuvent augmenter le poids des vésicules séminales ; cependant, les autres tissus dépendant des androgènes de l'essai ne répondront pas de manière similaire. Les substances chimiques antiandrogéniques peuvent agir comme des antagonistes des récepteurs d'androgènes ou des inhibiteurs de 5 α -réductase. L'effet des inhibiteurs de 5 α -réductase est variable, car la conversion en dihydrotestostérone plus active varie selon les tissus. Les antiandrogènes qui inhibent la 5 α -réductase, comme le finastéride, ont des effets plus marqués dans la prostate ventrale que dans les autres tissus lorsqu'on les compare à un antagoniste de RA fortement actif comme le flutamide. Cette différence de réponse en fonction des tissus peut être utilisée pour distinguer les modes d'action médiés par les RA de ceux médiés par la 5 α -réductase. De surcroît, le récepteur d'androgène est apparenté en termes d'évolution à celui d'autres hormones stéroïdiennes, et certaines autres hormones, administrées à des doses élevées supraphysiologiques peuvent lier le TP et jouer un rôle d'antagoniste de ses effets d'activation de la croissance (13). De plus, il est également plausible qu'un métabolisme stéroïdien activé et un abaissement corollaire de la teneur sérique en testostérone puissent réduire la croissance des tissus dépendant des androgènes. Par conséquent, tout résultat positif dans le bio-essai de Hershberger est normalement évalué par une approche par éléments de preuve qui comprend des essais *in vitro*, tels que les essais de liaison aux RA et aux récepteurs œstrogéniques (RE) et des essais d'activation de la transcription correspondants, ou d'autres essais *in vivo* qui analysent des tissus cibles des androgènes similaires, tels que l'essai sur mâle pubère, l'essai sur mâle adulte intact de 15 jours ou les essais à doses répétées pendant 28 jours ou 90 jours.

9. L'expérience montre que les androgènes xénobiotiques sont plus rares que les antiandrogènes xénobiotiques. On s'attend par conséquent à utiliser plus souvent le bio-essai de Hershberger pour le dépistage d'antiandrogènes. Toutefois, le mode opératoire d'essai d'androgènes est parfois recommandé pour des substances chimiques stéroïdiennes ou analogues aux stéroïdes ou pour des substances chimiques pour lesquelles des méthodes intégrées au niveau 1 ou 2 du cadre conceptuel (Annexe 2) ont fourni une indication d'éventuels effets androgéniques. De la même manière, des effets indésirables associés à des profils (anti)androgéniques peuvent être observés dans des essais de niveau 5, et nécessiter une évaluation visant à déterminer si une substance agit par un mode d'action endocrine.

10. Il est admis que tous les protocoles faisant appel à des animaux respectent les normes locales en matière de bien-être animal ; les descriptifs des soins et traitements figurant ci-après constituent donc des normes minimales auxquelles se substitueront les réglementations locales. D'autres recommandations relatives au traitement humain des animaux ont été formulées par l'OCDE (17).

11. Comme c'est le cas de tous les essais biologiques sur animaux expérimentaux, il conviendra d'évaluer soigneusement la nécessité d'une mise en œuvre de cette étude. Fondamentalement, deux raisons peuvent justifier une telle décision :

- risque d'exposition élevé (niveau 1 du Cadre conceptuel) ou indications d'une (anti)androgénicité dans des essais *in vitro* (niveau 2) incitant à mener des études en vue de déterminer si ces effets pourraient s'exercer *in vivo*;
- effets de nature (anti)androgénique dans des essais *in vivo* de niveau 4 ou 5 justifiant la mise en œuvre d'études sur le mode d'action spécifique, par exemple afin de déterminer si les effets sont dus à un mécanisme (anti)androgénique.

12. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice sont présentées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La sensibilité du bio-essai de Hershberger est due à l'utilisation de mâles chez lesquels la production d'androgènes endogènes est minimale. En effet, les mâles sont castrés et la castration est suivie d'un délai adéquat permettant la régression des tissus cibles jusqu'à un poids de base minimal et uniforme. Ainsi, lors de la détection d'une activité androgénique potentielle, les teneurs endogènes en androgènes en circulation sont faibles, l'axe hypothalamique-pituitaire-gonadal est incapable de les compenser par des mécanismes de rétroaction, la capacité des tissus à répondre est maximale, et la variabilité du poids initial des tissus est minimale. Lors de la détection d'une activité antiandrogénique potentielle, il est possible d'obtenir un gain pondéral des tissus plus substantiel lorsque ceux-ci sont stimulés par un androgène de référence. Par conséquent, dans le bio-essai de Hershberger, il ne faut que 6 animaux par groupe de dose alors que dans d'autres essais qui emploient des mâles pubères ou adultes, l'utilisation de 15 mâles par groupe de dose est conseillée.

14. La castration des rats mâles péripubertaires est réalisée de manière appropriée à l'aide d'anesthésiques et d'une technique aseptique approuvés. Des analgésiques sont administrés durant les quelques jours qui suivent l'intervention chirurgicale afin d'éliminer la gêne post-chirurgicale. La castration améliore la précision avec laquelle l'essai détecte les androgènes et les antiandrogènes faibles en supprimant les mécanismes de rétroaction endocrines compensatoires qui existent chez l'animal intact et peuvent atténuer les effets des androgènes et des antiandrogènes administrés, et élimine la large variabilité inter-individus des teneurs sériques en testostérone. Par conséquent, la castration réduit les nombres d'animaux requis pour le dépistage de ces activités endocrines.

15. Pour détecter une activité androgénique potentielle, la substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée (sc) pendant une période de dix jours consécutifs. Les substances de l'essai sont administrées à au moins deux groupes de traitement d'animaux expérimentaux en utilisant un niveau de dose par groupe. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Une augmentation de poids statistiquement significative de deux des organes cibles ou plus dans les groupes recevant la substance d'essai comparés aux groupes témoin recevant le véhicule indique un résultat positif pour la substance d'essai relativement à l'activité androgénique potentielle (voir paragraphe 60). Les androgènes comme la trenbolone, qui ne peuvent être réduits en 5α , présentent des effets sur le EABC et le gland plus prononcés que ceux du TP, mais tous les tissus doivent présenter une augmentation de la croissance.

16. Pour détecter une activité antiandrogénique potentielle, la substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée pendant une période de dix jours consécutifs simultanément à des doses quotidiennes de TP (0.2 ou 0.4 mg/kg/j) administrées par injection sous-

cutanée. Le programme de validation a montré que les doses de 0.2 ou 0.4 mg/kg/j de TP permettaient toutes deux la détection d'antiandrogènes et, par conséquent, il convient de choisir l'une des doses à utiliser dans l'essai. Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées à au moins trois groupes d'animaux expérimentaux traités, à raison d'un niveau de dose par groupe. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Une diminution statistiquement significative, par rapport aux groupes témoins ne recevant que du TP, du poids de deux organes cibles ou davantage dans les groupes de substance d'essai plus TP indique un résultat positif pour la substance d'essai en termes d'activité antiandrogénique potentielle (voir paragraphe 61).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce et de la souche

17. Le rat est utilisé en routine dans le bio-essai de Hershberger depuis les années 30. Au plan biologique, il est plausible que le rat et la souris présentent des réponses similaires, mais les 70 ans d'expérience avec le modèle de rat en font l'espèce de choix pour le bio-essai de Hershberger. De surcroît, les données issues du bio-essai pouvant servir de résultats préliminaires à une étude multigénérationnelle à long terme, il est ainsi possible d'utiliser dans les deux études des animaux de la même espèce, de la même souche et de la même source.

18. Ce mode opératoire remet aux laboratoires le soin de sélectionner la souche de rat à utiliser dans l'essai, qui sera en général celle habituellement employée dans le laboratoire concerné. On peut choisir les souches de rats de laboratoire couramment utilisées ; toutefois, il faut éviter les souches dont la maturation est significativement plus longue que 42 jours, car une castration des mâles à 42 jours peut empêcher la mesure des poids de gland, qui ne peut être effectuée qu'après séparation du prépuce de la tige pénienne. Ainsi, on n'utilisera pas de souches dérivées du rat Fisher 344, sauf dans de rares cas. La chronologie du développement sexuel du rat Fisher 344 est différente de celle des autres souches couramment utilisées, telles que les souches Sprague Dawley ou Wistar (16). Dans le cas où une telle souche est utilisée, il conviendra de castrer les individus au laboratoire à un âge légèrement postérieur et il faudra démontrer la sensibilité de la souche utilisée. La justification du choix d'une souche de rat est clairement établie par le laboratoire. Si l'essai de dépistage est préalable à une étude par voie orale à doses répétées, à une étude sur la reproduction et le développement ou à une étude à long terme, il conviendra d'utiliser de préférence des animaux issus de la même souche et de la même source dans toutes les études.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

19. Tous les modes opératoires respectent l'ensemble des normes locales en vigueur sur le soin des animaux de laboratoire. Les conditions d'entretien et de traitement décrites ici sont des normes minimales auxquelles se substituent des réglementations locales plus contraignantes, le cas échéant. La température du local expérimental est de 22 °C (à environ ± 3 °C). Le taux d'humidité relative est d'au moins 30 % et, de préférence, inférieur à 70 % en dehors des heures de nettoyage du local. On s'efforcera de maintenir l'humidité relative entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel. La séquence d'éclairement est de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

20. Il est préférable de loger les animaux en groupes plutôt que de les isoler, en raison de leur jeune âge et parce que les rats sont des animaux sociaux. Le logement de deux ou trois animaux par cage évite la concentration et le stress qui lui est associé, susceptible d'interférer avec le contrôle hormonal du développement du tissu sexuel accessoire. Les cages seront soigneusement nettoyées afin d'en éliminer tous les contaminants possibles et placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur

disposition sur les résultats. Le choix de cages de taille appropriée (~2000 centimètres carrés) évitera le surpeuplement.

21. Chaque animal est identifié individuellement (par exemple par une marque ou une étiquette à l'oreille) en utilisant une méthode éthiquement acceptable. La méthode d'identification est consignée.

22. Les animaux recevront de la nourriture et de l'eau potable à volonté. Les laboratoires qui mettent en œuvre le bio-essai de Hershberger utilisent le régime alimentaire du laboratoire qui est normalement utilisé dans les études d'essais sur les produits chimiques. Lors des études de validation du bio-essai, aucun effet ni variabilité attribuable au régime alimentaire n'a été observé. Le régime utilisé sera indiqué et un échantillon en sera conservé à des fins d'éventuelle analyse future.

Critères de performance relatifs aux poids des organes dépendant des androgènes

23. Au cours de l'étude de validation, aucune donnée n'a permis de démontrer qu'une diminution du poids corporel affectait les augmentations ou les réductions de croissance de poids des tissus cibles (c'est-à-dire des tissus qui doivent être pesés).

24. Les poids des organes dépendant des androgènes des différentes souches de rats utilisées avec succès dans le programme de validation sont plus élevés chez les souches de rats les plus lourdes que chez les souches plus légères. Par conséquent, les critères de performance du bio-essai de Hershberger n'incluent pas les poids absolus prévisibles des organes pour les témoins positifs et négatifs.

25. Le coefficient de variation (CV) d'un tissu étant inversement proportionnel à la puissance statistique, les critères de performance du bio-essai de Hershberger sont fondés sur des valeurs de CV maximales pour chaque tissu (tableau 1)¹. Les CV sont tirés des études de validation de l'OCDE. Dans le cas de résultats négatifs, les laboratoires examinent les CV du groupe témoin et du groupe de traitement à dose élevée afin de déterminer si les critères de performance de CV maximal ont été dépassés.

26. L'étude est répétée dans les cas suivants : 1) trois ou plus des dix CV individuels possibles dans les groupes témoin et de traitement à dose élevée dépassent les valeurs maximales indiquées pour les études d'agonistes et d'antagonistes dans le tableau 1, et 2) au moins deux des tissus cibles sont marginalement non significatifs, c'est-à-dire présentent des valeurs p comprises entre 0.05 et 0.10.

¹ Le CV limite pour un tissu donné a été identifié à partir d'un graphe de valeurs de CV - reportées successivement de la plus petite à la plus grande – pour toutes les moyennes de toutes les expériences de l'étude de validation en utilisant un modèle spécifique (agoniste ou antagoniste). Le CV limite est lu au point auquel les incréments entre les CV les plus élevés suivants de la série sont largement plus grands que ceux qui séparent les quelques CV précédents, ou "point de rupture". Il convient de noter que même si cette analyse a identifié des "points de rupture" relativement fiables pour le modèle des antagonistes de l'essai, les courbes de CV pour l'essai des agonistes présentaient une augmentation plus uniforme et l'identification d'un CV limite par cette méthode est donc quelque peu arbitraire.

Tableau 1 : CV maximum autorisés déterminés pour les tissus sexuels accessoires cibles dans le modèle sur rat castré dans les études de validation de l'OCDE

Tissu	Effets antiandrogéniques	Effets androgéniques
Vésicules séminales	40 %	40 %
Prostate ventrale	40 %	45 %
EABC	20 %	30 %
Glandes de Cowper	35 %	55 %
Gland	17 %	22 %

MODE OPERATOIRE

Respect de la réglementation et vérification au laboratoire

27. Il est inutile de démontrer la compétence du laboratoire avant le début de l'étude pour l'essai de Hershberger comme c'est le cas pour l'essai utéro-trophique (TG 440), car des témoins positifs (propionate de testostérone et flutamide) et négatifs sont simultanément inclus dans l'essai.

Nombre et condition des animaux

28. Chaque groupe d'essai et témoin comprend au moins 6 animaux. Ceci s'applique aux protocoles androgéniques et antiandrogéniques.

Castration

29. Une période d'acclimatation initiale de plusieurs jours après réception des animaux attestera que les sujets sont sains et performants. Des animaux castrés avant l'âge de 42 jours ou au 42^e jour postnatal (jpn) ne présentant pas toujours de séparation préputiale, il faut castrer les animaux au jpn 42 ou après, mais pas avant. Les animaux sont castrés sous anesthésie par incision dans le scrotum et prélèvement des testicules et de l'épididyme avec ligature des vaisseaux sanguins et des canalicules séminifères. Après confirmation de l'absence de saignement, le scrotum est refermé par des sutures ou des agrafes auto-serrantes. Les animaux sont traités par des analgésiques pendant les quelques jours qui suivent l'intervention chirurgicale afin d'atténuer toute gêne post-chirurgicale. Si les animaux sont acquis déjà castrés auprès d'un fournisseur d'animaux, celui-ci garantira leur âge et leur stade de maturité sexuelle.

Acclimatation après castration

30. Les animaux restent en acclimatation aux conditions de laboratoire pour permettre la régression des poids des tissus cibles pendant au minimum 7 jours après la castration. Ils sont observés quotidiennement, et tout animal présentant des signes de maladie ou d'anomalie physique est retiré. Ainsi, le début du traitement par administration des doses (à l'étude) peut commencer dès le 49^e jpn, mais jamais après le 60^e jpn. À l'autopsie, l'animal n'est pas âgé de plus de 70 jpn. Ce degré de flexibilité permet une programmation efficace du travail expérimental au laboratoire.

Poids corporel et randomisation des groupes

31. Les différences entre les poids corporels individuels représentent une source de variabilité entre les poids des tissus tant entre les groupes d'animaux qu'au sein de ces groupes. L'augmentation de la variabilité des poids des tissus se traduit par une augmentation du coefficient de variation (CV) et réduit la puissance statistique de l'essai (parfois aussi désignée par sensibilité de l'essai). Il convient par

conséquent de limiter les variations du poids corporel au plan expérimental ainsi qu'au plan statistique.

32. Au plan expérimental, il faut s'efforcer de réduire les variations de poids corporels au sein des groupes d'étude et entre eux. Tout d'abord, il convient d'écarter les animaux de taille anormalement grande ou petite et ne pas les intégrer dans la cohorte de l'étude. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne dépassent pas $\pm 20\%$ du poids moyen (par exemple, 175 g \pm 35 g pour les rats péripubertaires castrés). En second lieu, il faut répartir les animaux au hasard dans les groupes (témoin et traités), de façon à ce qu'il n'y ait aucune différence statistique de poids corporel moyen d'un groupe à l'autre. Le protocole de randomisation par blocs utilisé est consigné.

33. La toxicité étant susceptible de réduire le poids corporel dans les groupes traités par rapport à celui du groupe témoin, il faut utiliser comme covariable statistique le poids corporel au premier jour d'administration de la substance de l'essai et non le poids corporel à l'autopsie.

Posologie

34. Afin d'établir si une substance d'essai peut avoir une action androgénique *in vivo*, il suffit généralement d'utiliser deux groupes de doses de la substance d'essai auxquels s'ajoutent des témoins positifs et de véhicule (négatif) (voir paragraphe 43), et cette posologie est par conséquent préféré pour des raisons de bien-être animal. Si l'objectif est d'obtenir une courbe de la relation dose-effet ou d'extrapoler les résultats à des doses plus faibles, au moins 3 groupes de dose seront nécessaires. Si l'on souhaite obtenir des informations plus détaillées que la simple identification d'une l'activité androgénique (estimation de la puissance, par exemple), un autre régime posologique devra être envisagé. Si l'on cherche à tester des antiandrogènes, la substance d'essai est administrée en combinaison avec un agoniste d'androgène de référence. Il faut utiliser au moins 3 groupes d'essai avec différentes doses de la substance d'essai et un témoin positif et un témoin négatif (voir paragraphe 44). Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin devront subir exactement le même traitement que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé pour administrer la substance d'essai, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé dans les groupes d'essai.

35. Tous les niveaux de dose sont proposés et sélectionnés à la lumière des données existantes sur la toxicité et le comportement (toxico)-cinétique de la substance d'essai ou de substances connexes. Le niveau de dose le plus élevé est établi tout d'abord en fonction de la DL_{50} et/ou des informations sur la toxicité aiguë afin d'éviter le décès, la détresse ou la souffrance extrêmes des animaux (17) (18) (19) (20) et en second lieu, il convient de tenir compte des informations disponibles sur les doses utilisées dans des études sub-chroniques et chroniques. En général, la dose la plus élevée ne provoque pas de réduction du poids corporel final des animaux supérieure à 10 % du poids témoin. La dose la plus élevée est la plus haute dose qui assure la survie de l'animal et qui n'induit pas de toxicité ni de détresse significatives au bout de 10 jours consécutifs d'administration jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/jour (voir paragraphe 36), ou bien une dose inférieure induisant des effets (anti)androgéniques, quelle qu'elle soit. Pour un dépistage, de larges intervalles entre les doses sont acceptables, par exemple, une demi-unité logarithmique (soit un facteur de progression de 3,2) ou même une unité logarithmique. En l'absence de données appropriées, une étude préliminaire de détermination des doses (voir paragraphe 37) peut permettre de définir les doses qu'il convient d'utiliser.

Dose limite

36. Lorsque, dans un essai, la dose limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour et une dose inférieure dans le cadre des protocoles décrits par cette étude ne permet pas à produire de changement statistiquement significatif des poids des organes reproducteurs, on peut considérer qu'il est inutile de tester d'autres niveaux de dose. Le concept de dose limite s'applique dans tous les cas sauf lorsque des données d'exposition pour l'homme indiquent qu'il est nécessaire d'utiliser un niveau de dose plus élevé.

Détermination des doses

37. Le cas échéant, une étude préliminaire de détermination des doses peut être effectuée sur un petit nombre d'animaux afin de définir les groupes d'essai appropriés [Lignes directrices modifiées de l'OCDE pour les essais de toxicité aiguë (TG 420, TG 423, TG 425)]. L'objectif, dans le cas du bio-essai de Hershberger, est de choisir des doses qui assurent la survie des animaux et n'entraînent pas de détresse ni d'effets toxiques graves après dix jours consécutifs d'administration du produit chimique, jusqu'à une dose maximale de 1000 mg/kg/j comme il est indiqué dans les paragraphes 35 et 36. À cet égard, le document d'orientation de l'OCDE (17) qui définit les signes cliniques indicateurs de toxicité ou de détresse des animaux peut être utilisé. Lorsque cela est possible dans le cadre de cette étude préliminaire de détermination des doses, après dix jours d'administration, les tissus cibles peuvent être excisés et pesés environ 24 heures après administration de la dernière dose. Ces données peuvent ensuite contribuer à la sélection des doses dans l'étude principale.

Substances de référence et véhicule

38. L'agoniste d'androgènes de référence est le propionate de testostérone (TP), CAS No 57-82-5. La dose de TP de référence peut être égale à 0.2 mg/kg-pc/j ou bien à 0.4 mg/kg-pc/j. L'antagoniste d'androgènes de référence est le flutamide (FT), CAS No 1311-84-7. La dose de FT de référence est égale à 3 mg/kg-pc/j et le FT est co-administré avec la dose de TP de référence

39. Il est recommandé d'envisager d'utiliser pour commencer, dans la mesure du possible, une solution ou une suspension aqueuse. Toutefois, de nombreux ligands d'androgènes ou leurs précurseurs métaboliques sont plutôt hydrophobes, c'est pourquoi on utilise le plus souvent une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple, huile de maïs, d'arachide, de sésame ou d'olive). Les substances d'essai peuvent être dissoutes dans une quantité minimale d'éthanol 95 % ou d'autres solvants appropriés, puis diluées dans le véhicule de l'essai aux concentrations finales de l'étude. Les caractéristiques toxiques du solvant sont connues et évaluées sur un groupe témoin séparé traité uniquement avec le solvant. Si la substance d'essai est considérée comme stable, on peut légèrement chauffer le mélange et le soumettre à une action mécanique vigoureuse pour faciliter sa dissolution. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule est déterminée. Si la substance d'essai est stable pendant toute la durée de l'étude, une fraction aliquote initiale de la substance d'essai peut être préparée, puis les dilutions spécifiées sont réalisées quotidiennement en prenant soin d'éviter la contamination et la détérioration des échantillons.

Administration des doses

40. Le TP est administré par injection sous-cutanée, et le FT par gavage oral.

41. La substance d'essai est administrée par gavage oral ou injection sous-cutanée. Il faut tenir compte du bien-être des animaux et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai lors du choix de la voie d'administration. De surcroît, il convient de considérer les aspects toxicologiques

comme l'adéquation à la voie d'exposition de l'homme au produit chimique (gavage oral pour représenter une exposition par ingestion, injection sous-cutanée pour une exposition par inhalation ou adsorption cutanée), les informations toxicologiques existantes et les données sur le métabolisme et la cinétique (par exemple la nécessité d'éviter le métabolisme de premier passage, meilleure efficacité d'une des voies d'administration), avant de mettre en œuvre un essai approfondi à long terme lorsque des résultats positifs sont obtenus par injection.

42. Il faut administrer les doses aux animaux de la même manière et avec la même séquence temporelle pendant dix jours consécutifs à des intervalles d'environ 24 heures. Le niveau de dose est ajusté tous les jours en se fondant sur les mesures quotidiennes simultanées de poids corporel. Le volume de dose et le moment auquel elle est administrée sont notés chaque jour d'exposition. Il importe de veiller à ne pas dépasser la dose maximale mentionnée au paragraphe 35 pour pouvoir interpréter avec profit les données. La réduction du poids corporel, les signes cliniques et les autres données observées devront être soigneusement évalués dans cette perspective. Dans le cas d'un gavage oral, il faut utiliser une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximum de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal expérimental. Les directives locales de soins aux animaux sont observées, mais le volume n'excède pas 5 ml/kg de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas d'injections sous-cutanées, les doses sont injectées dans la région dorso-scapulaire ou lombaire à l'aide d'une aiguille stérile (de calibre 23 ou 25) et d'une seringue de tuberculination. Le rasage du site d'injection est facultatif. Toute perte ou fuite au site de l'injection ou toute administration incomplète sont consignées. Le volume total injecté par rat par jour ne dépasse pas 0.5 ml/kg de poids corporel.

Mode opératoire spécifique pour les agonistes d'androgènes.

43. Dans les essais d'agonistes d'androgènes, le véhicule est le témoin négatif et le groupe traité par TP est le témoin positif. L'activité biologique correspondant aux agonistes d'androgènes est testée par administration d'une substance d'essai à des groupes de traitement aux doses choisies pendant 10 jours consécutifs. Les poids des cinq tissus sexuels accessoires des groupes recevant la substance d'essai sont comparés à ceux du groupe recevant le véhicule afin de déterminer des augmentations pondérales statistiquement significatives.

Modes opératoires spécifiques pour les antagonistes d'androgènes et les inhibiteurs de 5 α -réductase

44. En ce qui concerne les essais d'antagonistes d'androgènes et d'inhibiteurs de 5 α -réductase, le groupe traité par TP joue le rôle de témoin négatif et le groupe recevant des doses de référence de TP et de FT co-administrées celui de témoin positif. L'activité biologique correspondant aux antagonistes d'androgènes et aux inhibiteurs de 5 α -réductase est analysée par administration d'une dose de référence de TP et administration de la substance d'essai pendant 10 jours consécutifs. Les poids des cinq tissus sexuels accessoires des groupes recevant du TP plus la substance d'essai sont comparés à ceux du groupe ne recevant que TP de référence afin de déterminer des diminutions des poids statistiquement significatives.

OBSERVATIONS

Observations cliniques

45. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour et plus fréquemment si des signes de toxicité sont constatés. Il faut les conduire de préférence chaque jour à la ou aux même(s) heure(s) et en tenant compte des prévisions des maxima d'effets après l'administration des doses. La mortalité, la morbidité et les signes cliniques généraux tels que les changements de

comportement, les modifications de la peau, du pelage, des yeux et des muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et les activités végétatives (larmolement, piloérection, taille des pupilles, respiration inhabituelle, par exemple) sont détectées sur tous les animaux.

46. Tous les animaux décédés sont retirés et éliminés sans autre analyse de résultat. La mortalité des animaux avant l'autopsie de quelque nature que ce soit est incluse dans le dossier de l'étude ainsi que toutes les raisons apparentes de mortalité. Tous les animaux moribonds sont humainement sacrifiés. Tous les animaux moribonds et sacrifiés par la suite sont inclus dans le dossier de l'étude avec les causes apparentes de morbidité.

Poids corporel et consommation alimentaire

47. Tous les animaux sont pesés quotidiennement à 0.1 g près, en commençant juste avant le début du traitement c'est-à-dire au moment de la répartition des animaux dans les groupes. La quantité de nourriture consommée durant la période de traitement peut éventuellement être mesurée cage par cage en pesant les distributeurs d'aliments. Ces données sur la consommation alimentaire sont exprimées en grammes par rat par jour.

Dissection et mesure des poids des tissus et des organes

48. Environ 24 heures après la dernière administration de la substance d'essai, les rats sont sacrifiés et exsanguinés conformément aux protocoles habituels du laboratoire réalisant l'étude, puis l'autopsie est effectuée. La méthode humaine de sacrifice est consignée dans le rapport du laboratoire.

49. Dans l'idéal, l'ordre dans lequel les groupes d'animaux sont autopsiés est aléatoire et ne suit pas l'ordre de croissance ou de décroissance des doses, ce qui pourrait affecter les données. Toutes les observations effectuées lors de l'autopsie, notamment les modifications pathologiques et les lésions visibles sont notées et consignées.

50. Les cinq tissus dépendant des androgènes (PV, VS, EABC, COW, G) font l'objet de mesures. Ces tissus sont excisés, soigneusement débarrassés des tissus et des graisses adhérents en excès, et leurs poids frais (non fixé) est déterminé. Chaque tissu est manipulé avec un soin particulier afin d'éviter la perte de fluide et la dessiccation, susceptibles d'introduire des erreurs significatives et une variabilité par réduction des poids consignés. Certains tissus peuvent être très petits ou difficiles à disséquer, ce qui est source de variabilité. Par conséquent, il est important que les modes opératoires de dissection standard utilisés pour les tissus sexuels accessoires soient bien maîtrisés par les personnes chargées cette tâche. Un manuel de Modes opératoires normalisés pour la dissection est disponible auprès de l'OCDE (21). Une formation poussée basée sur le guide de modes opératoires normalisés limitera une source de variation potentielle dans l'étude. Dans l'idéal, le même prosecteur sera chargé de la dissection d'un tissu donné afin d'éliminer les différences de traitement des tissus propres aux individus. Si cette approche s'avère impossible, le programme d'autopsie est conçu de façon à ce que chaque prosecteur dissèque un tissu donné de tous les groupes de traitement, et non pas tous les tissus d'un groupe témoin, tandis qu'un autre est responsable des groupes traités. Chaque tissu sexuel accessoire est pesé sans essuyage préalable à 0.1 mg près, et les poids sont notés pour chaque animal.

51. Certains tissus sont très petits ou difficiles à disséquer, ce qui est source de variabilité. Des études précédentes ont indiqué un intervalle de coefficients de variation (CV) qui se révèle différent selon les compétences du laboratoire. Dans quelques cas, de grandes différences entre les poids absolus de tissus tels que la PV et les COW ont été observées au sein d'un laboratoire particulier.

52. Les mesures de poids du foie, de la paire de reins et de la paire de glandes surrénales sont facultatives. Ces tissus sont également débarrassés de tous les fascia et graisses adhérents. Le foie est pesé et la mesure consignée à 0.1 g près et la paire de reins et la paire de glandes surrénales sont pesées et les mesures consignées à 0.1 mg près. Le foie, le rein et les glandes surrénales ne sont pas influencés uniquement par les androgènes ; ils fournissent également des indices utiles sur la toxicité systémique.

53. La mesure des teneurs sériques en hormone lutéinisante (LH), en hormone folliculo-stimulante (FSH) et en testostérone (T) est facultative. Les teneurs sériques en testostérone sont utiles pour déterminer si la substance de l'essai induit un métabolisme hépatique de la testostérone, susceptible de réduire les teneurs sériques. Si l'on ne dispose pas des données concernant la testostérone, cet effet pourrait paraître imputable à un mécanisme antiandrogénique. Les teneurs en LH livrent des informations sur la capacité d'un antiandrogène à réduire les poids des organes, mais également sur son aptitude à affecter la fonction hypothalamique-pituitaire, qui, dans les études à long terme, peut induire des tumeurs des testicules. La FSH est une hormone importante pour la spermatogénèse. La mesure des teneurs sériques en T4 et T3 est également facultative, et peut fournir des informations additionnelles utiles sur la capacité à rompre l'homéostasie de l'hormone thyroïdienne. En vue d'obtenir des mesures des teneurs en hormones, il faut anesthésier les rats avant l'autopsie et prélever du sang par ponction cardiaque, le procédé d'anesthésie étant choisi avec soin afin qu'il n'affecte pas la mesure des hormones. La méthode de préparation du sérum, la source des kits d'essai radio-immunologique ou d'autres techniques de mesure, les protocoles analytiques et les résultats sont consignés. Les teneurs en LH ainsi que les teneurs en testostérone sont notées en ng/ml de sérum.

54. La description de la dissection des tissus est basée sur un guide de dissection détaillé qui contient des photographies et est publié sous forme de supplément intégré au programme de validation (21). La page web de la Food and Drug Administration coréenne propose également une vidéo présentant la dissection (22).

- La surface ventrale de l'animal tournée vers le haut, déterminer si le prépuce du pénis s'est séparé du gland. Si c'est le cas, rétracter le prépuce et retirer le gland, le peser (à 0.1 mg près), et noter le poids ;
- Ouvrir la peau et la paroi abdominales, en exposant les viscères. S'il faut peser les organes facultatifs, prélever et peser le foie à 0.1 g près, prélever l'estomac et les intestins, prélever et peser à 0.1 mg près la paire de reins et la paire de glandes surrénales. Cette dissection expose la vessie et initie la dissection des tissus accessoires mâles cibles.
- Afin de disséquer la PV, séparer la vessie de la couche musculaire ventrale en découpant le tissu conjonctif le long de la ligne médiane. Déplacer la vessie dans la direction antérieure vers les vésicules séminales (VS), en découvrant les lobes gauche et droit de la prostate ventrale (recouverts d'une couche de graisse). Gratter soigneusement la graisse des lobes droit et gauche de la PV. Écarter doucement le lobe droit de la PV de l'urètre et disséquer le lobe de l'urètre. Tout en maintenant toujours le lobe droit de la PV, écarter doucement le lobe gauche de la PV de l'urètre puis le disséquer ; peser à 0.1 mg près et noter le poids.
- Afin de disséquer la vésicule séminale plus les glandes coagulantes (VSGC), déplacer la vessie en direction caudale, exposer le canal déférent et les lobes droit et gauche des VSGC. Empêcher la fuite du fluide par clampage d'une pince hémostatique à la base des VSGC, au point où le canal déférent rejoint l'urètre. Disséquer soigneusement les VSGC, en maintenant la pince hémostatique en place, retirer la graisse et les annexes, les placer dans une coupelle de

pesée tarée, retirer la pince hémostatique et peser à 0.1 mg près, puis noter le poids.

- Afin de disséquer les muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux (EABC), les muscles et la base du pénis sont exposés. Les muscles EA enveloppent le colon, tandis que les muscles EA antérieur et BC sont attachés aux bulbes péniens. La peau et les annexes de la région périnéale qui s'étendent de la base du pénis jusqu'à l'extrémité antérieure de l'anus sont retirés. Les muscles BC sont progressivement disséqués du bulbe pévien et des tissus. Le colon est coupé en deux, et la totalité de l'EABC peut être disséquée et retirée. L'EABC est débarrassé des graisses et des annexes, pesé à 0.1 mg près, puis le poids est noté.
- Après retrait de l'EABC, les glandes de Cowper ou bulbo-urétrales (COW) rondes sont visibles à la base des bulbes péniens et en position légèrement dorsale. Il est nécessaire de procéder à une dissection soigneuse pour éviter de couper la capsule mince et empêcher toute fuite de fluide. Peser la paire de COW à 0.1 mg près et noter le poids.
- En outre, lorsque du fluide s'échappe d'une glande quelle qu'elle soit au cours de l'autopsie et de la dissection, cette perte est consignée.

55. Si l'évaluation de chaque substance chimique nécessite d'autopsier davantage d'animaux qu'il n'est raisonnable en un seul jour, le début de l'étude est échelonné sur deux jours consécutifs, ce qui permettra d'échelonner l'autopsie et les tâches afférentes sur deux jours. Dans ce type de répartition, il convient d'utiliser la moitié des animaux d'un groupe de traitement par jour.

56. Les carcasses sont éliminées d'une manière appropriée après l'autopsie

RAPPORT

Données

57. Les données sont consignées individuellement (à savoir, poids corporel, poids des tissus sexuels accessoires, mesures facultatives et autres réponses et observations) et pour chaque groupe d'animaux (les moyennes et écarts types de toutes les mesures sont relevés). Les résultats sont résumés sous forme de tableaux faisant apparaître le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou présentant des signes de toxicité, et une description de ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité.

58. Le rapport final contient les informations suivantes :

Établissement de l'essai :

- Nom de l'établissement, adresse
- Directeur de l'étude et autres membres du personnel ainsi que leur responsabilité dans l'étude
- Dates de début et de fin de l'étude, c'est-à-dire premier jour d'administration de la substance d'essai et dernier jour de l'autopsie, respectivement.

Substance d'essai :

- Source, numéro de lot, identité, pureté, adresse complète du fournisseur et caractérisation de la ou des substance(s) d'essai

- Nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques ;
- Conditions de stockage et méthode et fréquence de préparation de la dilution
- Données obtenues sur la stabilité, quelles qu'elles soient
- Analyses des solutions/suspensions administrées, quelles qu'elles soient.

Véhicule :

- Caractérisation du véhicule (identité, fournisseur et numéro de lot)
- Justification du choix du véhicule (s'il ne s'agit pas d'eau)

Animaux expérimentaux et protocoles d'élevage des animaux

- Espèce/souche utilisée et justification du choix
- Source ou fournisseur des animaux, comprenant l'adresse complète
- Nombre et âge des animaux fournis
- Conditions d'hébergement (température, éclairage, etc.)
- Régime alimentaire (nom, type, fournisseur, numéro de lot, contenu et si elles sont connues, teneurs en phytoestrogènes)
- Litière (nom, type, fournisseur, contenu)
- Conditions de logement en cage et nombre d'animaux par cage ;

Conditions de l'essai

- - Age à la castration et durée de l'acclimatation après castration ;
- Poids de chaque animal au début de l'étude (à 0.1 g près) ;
- Procédé de randomisation et répartition dans les groupes de véhicule, de référence, de substance d'essai, et dans les cages
- Moyenne et écart-type des poids corporels dans chaque groupe chaque jour de pesée pendant toute l'étude ;
- Justification du choix des doses
- Voie d'administration de la substance d'essai et justification du choix de la voie d'exposition
- S'il s'agit d'un essai pour déterminer l'antiandrogénicité, traitement par TP (dose et volume)
- Traitement par la substance d'essai (dose et volume)
- Moment d'administration
- Modes opératoires d'autopsie, notamment moyens d'exsanguination et toutes les anesthésies
- Dans le cas d'analyses du sérum, les détails de la méthode sont consignés. Par exemple, si on utilise un RIA, le mode opératoire de RIA, la source des kits de RIA, les dates d'expiration des kits, le mode opératoire de comptage par scintillation et l'étalonnage sont consignés.

Résultats :

- Observations quotidiennes de chaque animal pendant l'administration de la dose, notamment :
 - Poids corporels (à 0.1 g près),
 - Signes cliniques (le cas échéant),
 - Mesures ou notes sur la consommation d'aliments.
- Observations à l'autopsie de chaque animal, notamment :
 - Date de l'autopsie,
 - Groupe de traitement de l'animal,
 - ID de l'animal,
 - Prosecteur,

- Moments de la journée auxquels sont réalisées l'autopsie et la dissection,
- Âge de l'animal,
- Poids corporel final à l'autopsie, en notant toute augmentation ou diminution statistiquement significative,
- Ordre d'excision et de dissection des animaux à l'autopsie,
- Poids des cinq tissus cibles dépendant des androgènes ;
 - Prostate ventrale (à 0.1 mg près)
 - Vésicules séminales plus glandes coagulantes, y compris les fluides (par paires à 0.1 mg près)
 - Complexe des muscles élévateur de l'anus et bulbo-caverneux (à 0.1 mg près)
 - Glandes de Cowper (poids frais – par paires, à 0.1 mg près).
 - Gland (poids frais à 0.1 mg près),
-
- Poids des tissus facultatifs, s'ils ont été mesurés :
 - Foie (à 0.1 mg près)
 - Reins (par paires à 0.1 mg près)
 - Glandes surrénales (par paires à 0.1 mg près)
-
- Remarques générales et commentaires
- Analyse des hormones sériques, le cas échéant
 - LH sérique (facultatif – ng par ml de sérum), et
 - T sérique (facultatif – ng par ml de sérum)
- Remarques générales et commentaires

Résumé des données :

Les données sont résumées sous forme de tableaux contenant la taille de l'échantillon pour chaque groupe, la moyenne de la valeur, et l'erreur type de la moyenne ou l'écart type. Les tableaux comprennent les poids corporels à l'autopsie, les variations du poids corporel entre le début de l'administration de la substance et l'autopsie, les poids des tissus sexuels accessoires cibles et tous les poids d'organes facultatifs.

Discussion des résultats :

Analyse des résultats

59. Les poids du corps et des organes à l'autopsie font l'objet d'une analyse statistique afin de déterminer des paramètres tels que l'homogénéité de la variance, à l'aide de transformations appropriées des données, selon les besoins. Les groupes de traitement sont comparés à un groupe témoin en utilisant des techniques telles que le test ANOVA suivi de comparaisons par paires (par exemple, test unilatéral de Dunnett) et les critères de différence statistique, par exemple $p \leq 0.05$. Les groupes présentant une signification statistique sont identifiés. Néanmoins, il faut éviter les poids d'organe relatifs, car les hypothèses statistiques qui fondent cette manipulation de données sont invalides.

60. En ce qui concerne l'agonisme des androgènes, le témoin est constitué du groupe d'essai recevant seulement le véhicule. Les caractéristiques du mode d'action d'une substance d'essai peuvent provoquer des réponses relatives différentes selon les tissus, par exemple, la trenbolone, qui ne peut être réduite en position 5-alpha, exerce des effets plus prononcés sur l'EABC et le G que le TP. Une augmentation statistiquement significative ($p \leq 0.05$) de deux des cinq poids de tissus dépendant des

androgènes cibles ou plus (VP, EABC, G, GC et VSGC) peut être considérée comme un résultat positif d'agoniste d'androgènes, et tous les tissus cibles doivent alors présenter un degré quelconque d'augmentation de croissance. L'évaluation combinée de toutes les réponses de tissus d'organes sexuels annexes peut être réalisée au moyen d'une analyse de données multivariées appropriée. L'analyse peut ainsi être affinée, en particulier dans les cas où un seul tissu donne une réponse statistiquement significative.

61. Pour étudier l'antagonisme des androgènes, le témoin est constitué du groupe d'essai avec l'androgène de référence (propionate de testostérone seulement). Les caractéristiques du mode d'action d'une substance d'essai peuvent aboutir à des réponses relatives différentes entre les tissus, par exemple les inhibiteurs de 5 α -réductase, comme le finastéride, exercent des effets plus prononcés sur la prostate ventrale que sur d'autres tissus par rapport à des antagonistes de RA puissants, comme le flutamide. Une réduction statistiquement significative ($p \leq 0.05$) de deux des cinq poids de tissus dépendant des androgènes cibles ou plus (VP, EABC, G, GC et VSGC) par rapport au traitement par TP seul peut être considérée comme un résultat positif d'antagoniste d'androgènes, et tous les tissus cibles doivent alors présenter une réduction de croissance à un degré quelconque. L'évaluation combinée de toutes les réponses de tissus d'organes sexuels annexes peut être réalisée au moyen d'une analyse de données multivariées appropriée. L'analyse peut ainsi être affinée, en particulier dans les cas où un seul tissu donne une réponse statistiquement significative.

62. Les données seront résumées sous forme de tableaux contenant la moyenne, l'erreur type de la moyenne (l'écart-type est également acceptable) et la taille d'échantillon pour chaque groupe. Des tableaux de données individuelles devront également être inclus. Les valeurs individuelles, la moyenne, l'erreur-type (écart-type) et les valeurs de CV des résultats du témoin devront être examinées afin de déterminer si elles respectent les critères acceptables de cohérence avec les valeurs historiques attendues. Si les CV sont supérieurs aux valeurs de CV indiquées dans le tableau 1 (voir paragraphe 25 et 26), il faudra déterminer, pour chaque poids d'organe, si des erreurs entachent l'enregistrement ou l'entrée des données ou si le laboratoire ne maîtrise pas encore la dissection soignée des tissus dépendant des androgènes et si un complément de formation ou de pratique serait justifié. Habituellement, les CV (écart-type divisé par poids moyen de l'organe) sont reproductibles d'un laboratoire à l'autre et d'une étude à l'autre. Les données présentées incluent au moins les poids de prostate ventrale, de vésicule séminale, de muscles élévateur de l'anus et bulbo-caverneux, des glandes de Cowper, du gland, du foie et les poids corporels ainsi que la variation de poids corporel entre le début de l'administration des doses et l'autopsie. Les données peuvent également être présentées après ajustement de covariance du poids corporel, mais sans omettre la présentation des données non ajustées. De surcroît, s'il n'y a pas séparation préputiale dans l'un quelconque des groupes, l'incidence de la séparation est notée et statistiquement comparée au groupe témoin en utilisant un test exact de Fisher.

63. Lors de la vérification des entrées des résultats dans l'ordinateur par comparaison aux fiches de résultats originelles afin d'en déterminer la précision, les valeurs de poids d'organes qui ne sont pas biologiquement plausibles ou varient de plus de trois écarts types par rapport à celles du groupe de traitement sont minutieusement examinées et il faudra peut-être les rejeter, comme étant vraisemblablement des erreurs de relevés.

64. La comparaison des résultats de l'étude avec les valeurs de CV de l'OCDE (dans le tableau 1) représente souvent une étape importante de l'interprétation en termes de validité des résultats de l'étude. Les données historiques concernant les groupes témoins qui ont reçu le véhicule sont conservées au laboratoire. Les données historiques concernant les réponses à des substances de référence positives, telles que TP et FT sont également conservées au laboratoire. Les laboratoires peuvent de surcroît tester

périodiquement la réponse à des agonistes et à des antagonistes d'androgènes faibles connus et conserver ces résultats. Ces données peuvent être comparées aux données dont dispose l'OCDE pour s'assurer que les méthodes du laboratoire présentent une précision statistique et une puissance statistique suffisantes.

ANNEXE 1DEFINITIONS

Androgénique : terme utilisé pour décrire une influence positive sur la croissance des tissus dépendant des androgènes

Antiandrogénique : capacité d'un produit chimique à supprimer l'action de TP dans un organisme de mammifère.

Date de naissance : jour 0 après la naissance.

Dose : quantité de substance d'essai administrée. Dans le bio-essai de Hershberger, la dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal expérimental par jour (mg/kg de poids corporel/jour).

Posologie : terme général recouvrant la dose, la fréquence d'administration et la durée d'administration.

Moribond est un terme utilisé pour décrire un animal entrain de mourir, c'est-à-dire proche de la mort.

Jour postnatal X : Xème jour de vie après le jour de la naissance.

Sensibilité : capacité d'une méthode d'essai à identifier correctement des substances chimiques dont la propriété est testée.

Spécificité : capacité d'une méthode d'essai à identifier correctement des substances chimiques qui n'ont pas la propriété testée.

Validation : procédé scientifique destiné à caractériser les conditions et les limites opératoires d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence dans un objectif particulier.

ANNEXE 2

Note : Document préparé par le Secrétariat du Programme sur les lignes directrices à partir de l'accord conclu à la 6^{ème} réunion du Groupe d'étude sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA)

Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens

<p>Niveau 1 Triage et hiérarchisation des priorités à la lumière des informations existantes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - propriétés physiques et chimiques, par exemple poids moléculaire, réactivité, volatilité, biodégradabilité - exposition des êtres humains et de l'environnement, par exemple volume de production, rejet, modes d'utilisation - dangers, par exemple données toxicologiques disponibles 	
<p>Niveau 2 Essais in vitro livrant des données mécanistiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> - affinité de liaison aux récepteurs des oestrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes - activation de la transcription - genèse de l'aromatase et des stéroïdes in vitro - reconnaissance/fixation sur le récepteur des hydrocarbures aromatiques - relations quantitative structure activité (QSAR's) - dépistages préliminaires à haut débit - fonction thyroïdienne - essai sur la vitellogénine des hépatocytes du poisson - autres, selon les besoins 	
<p>Niveau 3 Essais in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme et effet endocrinien</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Essai utérotrophique (oestrogènes) - Essai de Hershberger (androgènes) - fonctions hormonales non médiées par des récepteurs - autres fonctions (par exemple thyroïdienne) 	<ul style="list-style-type: none"> - essai sur la vitellogénine du poisson (oestrogènes)
<p>Niveau 4 Essais in vivo livrant des données sur plusieurs mécanismes et effets endocriniens</p>	<ul style="list-style-type: none"> - LD 407 affinée (indicateurs (d'effets) commandés par des mécanismes endocriniens) - essais de puberté chez les mâles et les femelles - essai sur l'adulte mâle intact 	<ul style="list-style-type: none"> - essai histopathologique sur les gonades des poissons - essai sur la métamorphose des grenouilles
<p>Niveau 5 Essais in vivo fournissant des données sur des effets mettant en jeu des mécanismes endocriniens et d'autres mécanismes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - étude de toxicité pour la reproduction sur une génération (LD 415 affinée)¹ - étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations (LD 416 affinée)¹ - essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (LD 421 affinée)¹ - étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (LD 422 affinée)¹ <p>¹ Les améliorations éventuelles seront examinées par le Groupe de gestion de la validation des essais sur les mammifères (VMG memm).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - essais portant sur une partie ou la totalité du cycle de vie des poissons, oiseaux, amphibiens et invertébrés (développement et reproduction)

Notes se rapportant au cadre conceptuel

Note 1 : Il est possible d'entrer dans le cadre et d'en sortir à tous les niveaux, suivant la nature des informations nécessaires à des fins d'évaluation des dangers et des risques.

Note 2 : Le niveau 5 relatif à l'écotoxicologie devrait inclure des indicateurs mettant en évidence le mode d'action des effets néfastes et d'éventuels dégâts au niveau des populations.

Note 3 : S'il existe un modèle multimodal couvrant plusieurs des essais fournissant des données sur un seul indicateur, ce modèle remplace ces essais.

Note 4 : L'évaluation de chaque substance chimique est à effectuer au cas par cas, à la lumière de toutes les informations disponibles et compte tenu de la fonction des niveaux du cadre.

Note 5 : La version actuelle du cadre ne doit pas être considérée comme exhaustive. Aux niveaux 3, 4 et 5, il inclut des essais déjà disponibles ou en cours de validation. Ces derniers sont provisoirement inclus ; ils seront confirmés une fois mis au point et validés.

Note 6 : La portée des essais du niveau 5 n'est pas strictement limitée. Les essais incorporés à ce niveau servent à l'évaluation des dangers et des risques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE. 1988. Rapport de la première réunion du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA), 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI. 1962. Standard Methods Adopted by Official Organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J et Ostby JS. 2005. Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD. 2006. Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD. 2008. Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD. 2007. Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE. 2006. The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.
- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E. 2007. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V. 1932. The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J* 26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R. 1932. The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J* 26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS. 1950. The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW. 1949. Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R. 1953. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.
- (14) Hilgar AG, Vollmer EP. 1964. Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington

- DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI. 1969. Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ. 2002. Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- (17) OCDE. 2000. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OCDE. 1982. Organisation de coopération et de développement économiques - Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OECD. 2001. Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 425.
- (20) OCDE. 2001. Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë . Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. 2006. The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- (23) OCDE 2008. Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD 2008. Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.