

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

ÉTUDE ÉTENDUE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice pour les essais (LD) s'appuie sur un projet d'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération F1, réalisée au cours des différents stades de la vie, proposé par le comité technique ACSA (Agricultural Chemical Safety Assessment) du Health and Environmental Sciences Institute (HESI) de l'ILSI (Institut International Life Science Institute), tel que publié dans Cooper et al., 2006 (1). Plusieurs améliorations et clarifications ont été apportées à la méthodologie de l'étude afin de la rendre adaptable et de mettre en valeur l'importance de s'appuyer sur les connaissances existantes, tout en mettant à profit les observations en cours d'étude pour orienter et développer l'essai. Cette Ligne directrice fournit une description détaillée du mode opératoire de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération. Elle décrit trois cohortes d'animaux de génération F1:

- Cohorte 1 : évaluation des effets observés sur la reproduction/le développement ; cette cohorte peut ensuite être étendue à des animaux de génération F2.
- Cohorte 2 : évaluation de l'impact potentiel de l'exposition aux produits chimiques sur le développement du système nerveux.
- Cohorte 3 : évaluation de l'impact potentiel de l'exposition aux produits chimiques sur le développement du système immunitaire.

2. Il convient que les décisions d'étendre l'évaluation à une deuxième génération et d'exclure les cohortes servant à déterminer la neurotoxicité pour le développement et/ou l'immunotoxicité pour le développement soient prises sur la base des connaissances existantes concernant le produit chimique testé, ainsi que des impératifs fixés par différentes autorités réglementaires. La présente LD vise à détailler la manière dont l'étude peut être menée et dont il convient d'évaluer les diverses cohortes.

3. La procédure étayant la décision de déclencher en cours d'étude la production d'une seconde génération est décrite dans le document d'orientation 117 (39) à l'intention des autorités réglementaires recourant aux déclencheurs internes.

© OCDE (2018)

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: <http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation>.

Selon la Décision du Conseil de déléguer son autorité pour les amendements à l'Annexe I de la Décision du Conseil sur l'Acceptation Mutuelle des Données dans l'évaluation des produits chimiques [C(2018)49], cette Ligne directrice a été approuvée par la Réunion Conjointe du Comité des Produits Chimiques et le Groupe de Travail sur les Produits Chimiques, les Pesticides et la Biotechnologie, par procédure écrite le 25 juin 2018.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET OBJECTIFS

4. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération vise principalement à évaluer les étapes de la vie non couvertes par les autres types d'études de toxicité et à examiner les effets potentiels d'une exposition pré- et postnatale aux produits chimiques. Pour mesurer les effets sur la reproduction, on songera d'abord à utiliser, s'ils sont disponibles, les résultats d'études à doses répétées (notamment études de dépistage de la toxicité pour la reproduction, comme la LD 422 (32)), ou d'essais de dépistage à court terme des perturbateurs endocriniens, (par exemple bio-essai utéro-trophique - LD 440 (36) ; bio-essai de Hershberger - LD 441 (37)) pour mettre en évidence un impact sur les organes reproducteurs mâles et femelles. Ces résultats porteront par exemple sur la spermatogenèse (examen histopathologique des testicules) chez les mâles et sur les cycles œstraux, la numération des follicules/maturation des ovocytes et l'intégrité des ovaires (examen histopathologique) chez les femelles. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération permet donc d'examiner les effets sur la reproduction à partir d'interactions entre mâles et femelles, entre femelles et conceptus, et entre femelles et descendants et sur la génération F1 après la maturité sexuelle (voir document d'orientation 151 en appui à cette LD (40)).

5. Cette LD est élaborée en vue de permettre l'évaluation des effets pré- et postnataux de produits chimiques sur le développement, ainsi que l'examen exhaustif de la toxicité systémique chez les femelles gravides et allaitantes ainsi que chez la descendance (petits et adultes). L'examen détaillé des principaux effets sur le développement, comme la viabilité de la descendance, la santé des nouveau-nés, le niveau de développement à la naissance et le développement physique et fonctionnel jusqu'à l'âge adulte, doit permettre de repérer les organes cibles spécifiques chez les descendants. En outre, l'étude fournira et/ou confirmera des informations quant aux effets du produit chimique testé sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles chez l'adulte. On tiendra notamment compte des paramètres suivants, sans s'y limiter : fonction gonadique, cycle œstral, maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, comportement d'accouplement, conception, gestation, mise-bas et lactation. Par ailleurs, les résultats de l'évaluation de la neurotoxicité pour le développement et de l'immunotoxicité pour le développement caractériseront les effets potentiels sur ces systèmes. Les données découlant de ces essais devront permettre de déterminer les concentrations sans effet nocif observé (CSENO), les concentrations minimales avec effet nocif observé (CMENO) et/ou les doses de référence pour les divers effets évalués, et/ou servir à caractériser les effets repérés dans des études à doses répétées antérieures et/ou à orienter les essais ultérieurs.

6. Le protocole est représenté schématiquement à la figure 1. Le produit chimique testé est administré en continu à plusieurs groupes de mâles et femelles sexuellement matures, à différentes doses échelonnées suivant une gradation. Cette génération parentale (P) reçoit la substance pendant un temps défini avant l'accouplement (période fixée d'après les informations disponibles sur le produit chimique testé, mais ne pouvant pas être inférieure à deux semaines) puis pendant une période d'accouplement de deux semaines. Les mâles P sont ensuite traités au moins jusqu'au sevrage de la génération F1. Leur traitement dure au minimum 10 semaines, et peut être prolongé s'il y a lieu de clarifier les effets sur la reproduction. Le traitement des femelles P se poursuit pendant la gestation et l'allaitement jusqu'au sacrifice, après le sevrage de leurs portées (soit 8 à 10 semaines de traitement). La descendance F1 reçoit encore le produit chimique testé du sevrage jusqu'à l'âge adulte. En cas d'évaluation d'une seconde génération (voir

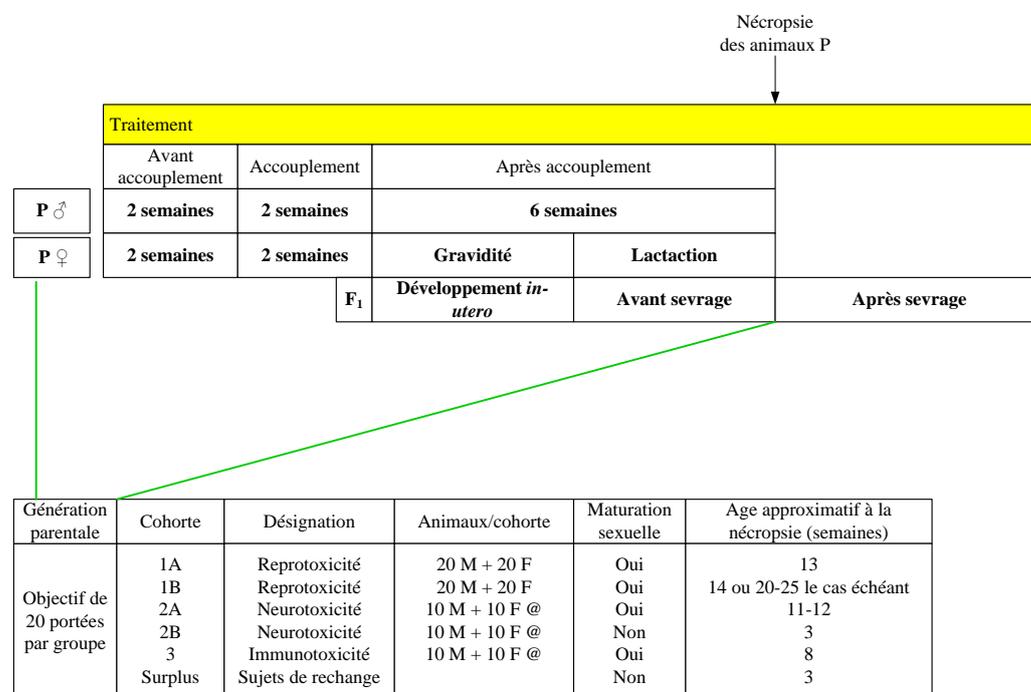
document d'orientation 117 (39)), la descendance F1 continue de recevoir le traitement jusqu'au sevrage des petits F2, ou jusqu'à la fin de l'étude.

7. Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité ; cet examen s'attache particulièrement à l'intégrité et au fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles ainsi qu'à la santé, la croissance, le développement et la fonction reproductrice de la descendance. Au moment du sevrage, les descendants sélectionnés sont affectés à divers sous-groupes (cohortes 1 à 3, voir paragraphes 34 et 35 et figure 1) afin de faire l'objet d'évaluations supplémentaires, portant notamment sur la maturation sexuelle, l'intégrité et le fonctionnement des organes reproducteurs, les effets neurologiques et comportementaux, et les fonctions immunitaires.

8. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le Document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (34).

9. Quand un nombre suffisant d'études aura été conduit afin d'analyser l'impact de cette nouvelle méthode d'essai, la LD sera examinée et, si nécessaire, révisée à la lumière de l'expérience acquise.

Figure 1 : Protocole de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération



@ un par portée, représentatif si possible, de 20 portées au total

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE / PRÉPARATIONS POUR L'ESSAI

Animaux

Choix des espèces et des souches

10. L'espèce utilisée pour l'étude de toxicité pour la reproduction est choisie avec soin en fonction de l'ensemble des données disponibles. Cependant, en raison de l'abondance des données existantes et de la comparabilité par rapport aux essais de toxicité générale, le choix se porte généralement sur le rat et les critères et recommandations présentés dans la présente LD se rapportent à cette espèce. Si on utilise une autre espèce, il faut le justifier et adapter le protocole en conséquence. Les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement sont à éviter.

Âge, poids corporel et critères d'inclusion

11. On utilisera des animaux parents sains, n'ayant pas été soumis à des expériences antérieures. L'étude porte à la fois sur les mâles et les femelles, lesquelles sont nullipares et non gravides. Les animaux P sont sexuellement matures, de poids similaire (à sexe identique) au début du traitement, d'âge similaire (environ 90 jours) au moment de l'accouplement, et représentatifs de l'espèce et de la souche étudiés. Ils sont acclimatés pendant au moins 5 jours après leur arrivée au laboratoire. Les animaux sont répartis au hasard entre groupes de traitement et groupes témoins, de manière à ce que les poids moyens de chaque groupe soient comparables (c'est-à-dire à $\pm 20\%$ de la moyenne globale).

Conditions d'encagement et d'alimentation

12. L'animalerie est à 22 °C (± 3 °C), avec une humidité relative située entre 30 et 70 %, l'idéal étant qu'elle soit maintenue entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. On contrôlera attentivement la teneur en phytoestrogènes de l'alimentation, qui est susceptible, si elle est élevée, de modifier certains effets sur la reproduction. Les régimes alimentaires standard à formulation libre, dans lesquels la teneur en substances œstrogéniques a été réduite, sont recommandés (2), (30). Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'assurer un mélange convenable du produit chimique testé chimique testé, lorsque celle-ci est administrée dans les aliments. Il convient de vérifier la concentration, l'homogénéité et la stabilité du produit chimique testé chimique testé dans l'alimentation. La nourriture et l'eau de boisson seront analysées régulièrement à la recherche de contaminants. Des échantillons de chaque lot de nourriture utilisé au cours de l'étude sont conservés dans des conditions appropriées (par exemple congelés à -20 °C), jusqu'à la finalisation du rapport, dans l'éventualité où les résultats exigeraient une analyse supplémentaire des ingrédients consommés.

13. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe recevant la même dose. On envisagera un encagement individuel pour éviter d'éventuelles blessures (par exemple entre mâles après la période d'accouplement). Il convient que l'accouplement se déroule dans des cages propices à cette fin. Dès constatation de la

copulation, les femelles présumées gravides sont hébergées séparément dans des cages destinées à la mise-bas ou à la maternité, où leur sont fournis des matériaux de nidification appropriés et déterminés. Les portées sont hébergées avec leur mère jusqu'au sevrage. Les animaux F1 sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe et recevant la même dose, du sevrage au sacrifice. On peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Le type de litière choisi contient le moins possible de phytoestrogènes.

Nombre et identification des animaux

14. Normalement, chaque groupe d'essai ou groupe témoin contient un nombre de couples suffisant pour produire au moins 20 femelles gravides par groupe de dose. On cherche à obtenir suffisamment de gestations pour assurer une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gravidité et le comportement maternel de la génération P, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité. Si le nombre de femelles gravides souhaité n'est pas atteint, l'étude n'est pas nécessairement invalidée et chaque échec sera analysé au cas par cas à la recherche d'éventuels liens de cause à effet avec le produit chimique testé.

15. Chaque animal P se voit attribuer un numéro d'identification unique avant le début du traitement. Si les données historiques du laboratoire suggèrent qu'une part importante des femelles est susceptible de ne pas présenter des cycles œstraux réguliers (de 4 ou 5 jours), il est conseillé d'étudier les cycles œstraux avant d'administrer les doses. Une autre option consiste à agrandir les groupes de façon à garantir qu'au moins 20 femelles dans chaque groupe présentent des cycles œstraux réguliers (4 ou 5 jours) au moment de commencer le traitement. Tous les descendants F1 sont identifiés de manière unique lors du premier examen des nouveau-nés effectué le jour de leur naissance (jour post-natal : JPN 0) ou un jour après (JPN 1). Tout au long de l'étude, on gardera la trace de la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1 puis de la génération F2, si elle est produite.

Substance d'essai

Informations disponibles sur le produit chimique testé

16. Il importe d'examiner les données existantes pour choisir la voie d'administration, le véhicule et l'espèce utilisée, sélectionner les doses et éventuellement adapter le programme de traitement. Ainsi, il convient que la planification d'une étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération tienne compte de toutes les informations pertinentes disponibles concernant le produit chimique testé, à savoir propriétés physico-chimiques, toxicocinétiques (y compris métabolisme propre à l'espèce) et toxicodynamiques, relations structure-activité (RSA), mécanismes métaboliques in vitro, résultats des études de toxicité antérieures et données utiles sur les analogues de structure. Certaines informations préliminaires sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME), ainsi que sur la bioaccumulation, peuvent être déduites de la structure chimique, des données physico-chimiques, de la capacité de liaison aux protéines plasmatiques ou des études toxicocinétiques ; les résultats des études de toxicité livrent des informations supplémentaires, notamment sur la CSENO, le métabolisme ou l'induction du métabolisme.

Prise en compte des données toxicocinétiques

17. Même si elles ne sont pas obligatoires, les données toxicocinétiques tirées d'études antérieures préliminaires de détermination des concentrations ou autres études sont extrêmement utiles pour planifier l'étude, sélectionner les niveaux de dose et interpréter les résultats. Sont particulièrement utiles les données qui : 1) vérifient l'exposition à le produit chimique testé (ou à ses métabolites importants) des fœtus et des petits en cours de développement, 2) livrent une estimation de la dosimétrie interne, et 3) évaluent la saturation potentielle des mécanismes cinétiques en fonction de la dose. Il convient aussi de prendre en compte, lorsqu'elles sont disponibles, d'autres informations toxicocinétiques comme le profil des métabolites, la fonction concentration-temps, etc. On pourra aussi recueillir pendant l'étude principale des données toxicocinétiques supplémentaires, à condition que cela n'interfère pas avec la détermination et l'interprétation des principaux effets étudiés. En règle générale, les données toxicocinétiques suivantes seront utiles pour planifier l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération :

- En fin de gestation (par exemple au 20e jour de gestation) – sang de la mère et du fœtus
- Au milieu de l'allaitement (JPN 10) – sang maternel, sang du petit et/ou lait
- Peu après le sevrage (par exemple, JPN 28) – échantillons sanguins des petits sevrés.

La souplesse sera de mise dans la détermination des substances spécifiques à analyser (par exemple le composé principal et/ou ses métabolites) et du programme d'échantillonnage. Par exemple, le nombre et le moment des prélèvements d'échantillons le jour prévu dépendront des voies d'exposition et des connaissances existantes concernant les propriétés toxicocinétiques chez les animaux non gravides. Quand le produit chimique testé est administrée dans la nourriture, il suffit de prélever les échantillons à heure fixe les jours concernés, tandis que pour l'administration par gavage, des prélèvements supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires dans la même journée pour obtenir une meilleure estimation de la gamme des doses internes. Il n'est toutefois pas nécessaire de tracer l'intégralité de la fonction concentration-temps, pour quelque jour de prélèvement que ce soit. Si nécessaire, les prélèvements sanguins destinés aux analyses des fœtus et des nouveau-nés peuvent être regroupés par sexe pour une même portée.

Voie d'administration

18. Il convient que le choix de la voie d'administration tienne compte de la voie ou des voies les plus appropriées à l'exposition humaine. Bien que le protocole prévoie l'administration du produit chimique testé chimique testé dans la nourriture, il peut être modifié au profit d'une autre voie (eau de boisson, gavage, inhalation, voie cutanée), en fonction des caractéristiques du produit et des informations recherchées.

Choix du véhicule

19. S'il y a lieu, le produit chimique testé est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, de recourir en priorité à une solution ou suspension aqueuse, ou à défaut à une solution ou suspension huileuse (par exemple dans l'huile de maïs). Si le véhicule n'est pas aqueux, il convient que sa toxicité soit connue.

Les véhicules susceptibles de présenter une toxicité intrinsèque sont à proscrire (par exemple acétone, DMSO). Il faut déterminer la stabilité du produit chimique testé chimique testé dans le véhicule. Il convient en outre de tenir compte des caractéristiques suivantes lorsqu'un véhicule ou un autre adjuvant est utilisé pour faciliter l'administration : effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention du produit chimique testé chimique testé ; effets sur les propriétés chimiques du produit chimique testé chimique testé susceptibles de modifier sa toxicité ; et effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

Choix des doses

20. Normalement, l'étude porte sur au moins trois niveaux de dose et un témoin concomitant. Pour sélectionner les niveaux de dose appropriés, l'expérimentateur tient compte de toutes les informations disponibles, y compris les données relatives au dosage des études antérieures, les résultats toxicocinétiques concernant les animaux gravides ou non gravides, l'importance du transfert dans le lait, et les estimations de l'exposition humaine. Si les données toxicocinétiques disponibles indiquent une saturation des mécanismes toxicocinétiques en fonction de la dose, on s'efforcera d'éviter les doses élevées induisant clairement une saturation, à condition, bien entendu, que les expositions humaines attendues soient bien inférieures à ce seuil de saturation. Le niveau de la dose maximale devra alors correspondre au point d'inflexion vers un comportement toxicocinétique non linéaire, ou lui être légèrement supérieur.

21. À défaut de données toxicocinétiques pertinentes, les niveaux de dose sont définis en fonction des effets toxiques, dans la limite des propriétés physiques/chimiques du produit chimique testé chimique testé. Si les niveaux de dose sont fixés d'après la toxicité, la dose maximale est celle qui induit une certaine toxicité systémique, sans provoquer de décès ni de souffrances aiguës des animaux.

22. Lors de la sélection des doses, le directeur de l'étude devra considérer au préalable et s'assurer que les données générées permettent de satisfaire les exigences réglementaires parmi les pays de l'OCDE, comme il convient (évaluation des dangers et des risques, classification et étiquetage, évaluation des perturbateurs endocriniens, par exemple).

23. On sélectionnera une séquence de doses décroissantes afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et de déterminer les CSENO ou les doses proches de la limite de détection, ce qui permettra de déduire une dose de référence pour le(s) paramètre(s) d'évaluation le(s) plus sensible(s). Pour éviter des écarts de dose importants entre CSENO et CMENO, le recours à des multiples de deux ou quatre est généralement optimal. L'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à l'application d'intervalles très espacés (par exemple supérieur à un facteur dix) entre les doses.

24. Les animaux du groupe témoin sont manipulés de la même manière que les animaux traités, à l'exception du fait qu'ils ne reçoivent pas le produit chimique testé. Ce groupe témoin ne sera pas traité ou recevra un placebo, ou le véhicule si l'administration du produit chimique testé chimique testé en nécessite un. Si un véhicule est employé, les animaux du groupe témoin devront recevoir le plus grand volume utilisé de ce véhicule.

Essai limite

25. Si des essais à doses répétées conduits à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ne produisent aucun effet toxique observable, ou s'il n'y a pas de raison de penser que la substance est toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues et des propriétés métaboliques in vivo/in vitro similaires, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. Dans cette éventualité, l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération se limitera à un groupe témoin et à une dose unique d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Cependant, si cette dose limite provoque des signes de toxicité pour la reproduction ou le développement, d'autres études conduites à des doses inférieures s'imposent pour définir une CSENO. Ces remarques concernant l'essai limite ne sont valables que si le niveau de l'exposition humaine n'implique pas d'évaluer des doses supérieures.

PROTOCOLES*Exposition de la descendance*

26. On privilégiera l'administration dans la nourriture comme voie d'exposition. Dans le cas des études par gavage, il faut noter que normalement, les petits ne recevront le produit chimique testé qu'indirectement par le lait maternel jusqu'à ce qu'on leur administre la dose directement, à partir du sevrage. Lorsque le produit chimique testé est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits recevront aussi le produit chimique testé directement, dès qu'ils commenceront à s'alimenter tout seuls pendant la dernière semaine d'allaitement. La méthodologie est modifiée lorsque l'excrétion du produit chimique testé dans le lait est faible ou que l'exposition continue de la descendance n'est pas avérée. Dans ces cas, on envisagera de traiter directement les petits pendant l'allaitement en fonction des données toxicocinétiques disponibles, de la toxicité pour la descendance ou de l'évolution des biomarqueurs (3), (4). Il convient d'évaluer soigneusement les avantages et les inconvénients avant la mise en œuvre d'études d'administration directe aux petits allaités (5).

Programme du traitement et administration des doses

27. Il se peut que l'on dispose d'informations sur les cycles œstraux, de données histopathologiques sur les tractus reproducteurs mâles et femelles et d'analyses des spermatozoïdes testiculaires/épididymaires provenant d'études de toxicité à doses répétées antérieures d'une durée adéquate. Pour ce qui est de l'Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, la durée du traitement avant l'accouplement doit donc permettre de détecter les effets des modifications fonctionnelles susceptibles de perturber le comportement d'accouplement et la fertilisation. Il convient que le traitement avant l'accouplement dure suffisamment longtemps pour atteindre des conditions d'exposition stables chez les mâles et les femelles P. Généralement, une période de deux semaines conviendra pour les deux sexes. Chez les femelles, cette période correspond à 3 à 4 cycles œstraux complets et devrait suffire à identifier d'éventuels effets nocifs sur la cyclicité. Chez les mâles, elle correspond à la durée nécessaire à la migration des spermatozoïdes en maturation dans l'épididyme, et devrait permettre de détecter les effets post-testiculaires sur le sperme (au cours des derniers stades de la spermiation et de la maturation des spermatozoïdes épididymaires) au moment de l'accouplement. Au moment du sacrifice, quand l'examen histopathologique des testicules et épididymes et l'analyse des caractéristiques du sperme sont programmés, les mâles P et F1 auront donc

été exposés à le produit chimique testé pendant au moins un cycle entier de spermatogenèse (6) (7) (8) (9) et document d'orientation 151 (40).

28. Les scénarios d'exposition des mâles avant l'accouplement peuvent être adaptés si des études antérieures ont clairement mis en évidence une toxicité testiculaire (anomalie de la spermatogenèse) ou des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des spermatozoïdes. De la même manière, pour les femelles, l'existence d'effets avérés du produit chimique testé chimique testé sur les cycles œstraux et par conséquent sur la réceptivité sexuelle peut motiver une modification des scénarios d'exposition avant l'accouplement. Dans certains cas particuliers, on pourra attendre de détecter des spermatozoïdes par frottis vaginal avant de commencer le traitement des femelles P (voir document d'orientation 151 (40)).

29. Une fois que la durée de la période d'exposition avant l'accouplement est définie, les animaux sont traités en continu avec le produit chimique testé, 7 jours sur 7 jusqu'à la nécropsie. Le mode d'administration sera le même pour tous les animaux. Le traitement se poursuivra pendant les deux semaines de la période d'accouplement et, pour les femelles P, au cours de la gestation puis de l'allaitement jusqu'à leur sacrifice après le sevrage. Les mâles seront traités de la même façon jusqu'à leur sacrifice, au moment du sevrage des animaux F1. En ce qui concerne la nécropsie, la priorité est donnée aux femelles qui seront nécropsiées le même jour ou un jour similaire de lactation. La nécropsie des mâles peut s'étaler sur un plus grand nombre de jours, selon les équipements du laboratoire. À moins d'avoir débuté pendant la période de lactation, l'administration du produit chimique testé chimique testé directement aux mâles et femelles F1 sélectionnés commence au moment du sevrage et se poursuit jusqu'à la date programmée pour la nécropsie, en fonction de la cohorte.

30. Il importe de s'assurer que les quantités de substances administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Lorsque le produit chimique testé est ajoutée à la nourriture, deux possibilités sont offertes : soit le maintien d'une concentration constante dans les aliments (ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux ; il y a lieu de préciser l'option retenue.

31. Si le produit chimique testé est administrée par gavage, le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne dépasse pas 1 ml/100 g de poids corporel (0.4 ml/100 g de poids pour l'huile, de maïs par exemple). S'il ne s'agit pas de substances irritantes ou corrosives dont les effets doivent en principe s'intensifier aux concentrations supérieures, on réduira au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses. Le produit est administré chaque jour à heure fixe. La dose reçue par chaque animal est normalement calculée sur la base de la pesée la plus récente de l'animal, et est ajustée au moins une fois par semaine pour les mâles adultes et les femelles adultes non gravides, et tous les deux jours pour les femelles gravides et les descendants F1 si elle est administrée avant le sevrage et pendant les deux semaines qui suivent le sevrage. Si les données toxicocinétiques indiquent un faible transfert du produit chimique testé chimique testé dans le placenta, il faudra éventuellement revoir la dose administrée par gavage pendant la dernière semaine de gestation afin d'éviter de traiter la mère avec une dose excessivement toxique. Le jour de la mise-bas, les femelles ne sont pas traitées par gavage ou toute autre voie d'administration impliquant la manipulation de l'animal ; il est en effet préférable de ne pas les traiter ce jour-là plutôt que de perturber le processus de la naissance.

Accouplement

32. Chaque femelle P est placée avec un seul mâle non apparenté choisi au hasard dans le même groupe de dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Si le nombre de mâles est insuffisant, en raison par exemple de décès de mâles avant la mise en couple, on pourra placer un ou plusieurs des mâles s'étant déjà accouplés avec une seconde femelle (1:1) afin que toutes les femelles aient un partenaire. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (observation de sperme ou d'un bouchon vaginal). Les animaux sont séparés dès que possible une fois que la copulation a été confirmée. Si les animaux ne se sont toujours pas accouplés au bout de deux semaines, ils sont séparés sans autre tentative d'accouplement. Les couples sont clairement identifiés dans les résultats.

Taille des portées

33. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de cinq mâles et cinq femelles par portée. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel. Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles).

Sélection des petits pour les études après le sevrage (voir figure 1)

34. Au moment du sevrage (vers le JPN 21), on sélectionne des petits de toutes les portées disponibles, avec un maximum de 20 portées par groupe de dose et témoin, afin de les soumettre à des examens ultérieurs et de les élever jusqu'à la maturation sexuelle (sauf si des essais sont nécessaires avant). La sélection des petits est aléatoire, si ce n'est qu'il convient d'écarter les individus clairement chétifs (dont le poids corporel est inférieur de plus de deux écarts-types au poids moyen des petits de la même portée), dans la mesure où ils ne sont sans doute pas représentatifs du groupe de traitement.

Au JPN 21, les petits F1 sélectionnés sont affectés au hasard à l'une des trois cohortes d'animaux suivantes :

Cohorte 1 (1A et 1B) = essai de toxicité pour la reproduction/le développement

Cohorte 2 (2A et 2B) = essai de neurotoxicité pour le développement

Cohorte 3 = essai d'immunotoxicité pour le développement

Cohorte 1A : un mâle et une femelle/portée/groupe (20/sexe/groupe) : sélection prioritaire pour l'évaluation primaire des effets sur l'appareil reproducteur et de la toxicité générale.

Cohorte 1B : un mâle et une femelle/portée/groupe (20/sexe/groupe) : sélection prioritaire pour l'évaluation ultérieure de la capacité de reproduction lors de l'accouplement d'animaux F1 (voir document d'orientation 117 (39)), et pour obtenir des informations histopathologiques supplémentaires dans le cas d'agents présumés toxiques pour la reproduction ou le système endocrinien, ou quand les résultats de la cohorte 1A sont équivoques.

Cohorte 2A : total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe ; un mâle ou une femelle par portée) destinés à des tests neurocomportementaux suivis d'un examen neurohistopathologique à l'âge adulte.

Cohorte 2B : total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe ; un mâle ou une femelle par portée) destinés à un examen neurohistopathologique au moment du sevrage (JPN 21 ou JPN 22). Si les animaux ne sont pas assez nombreux, ils seront affectés en priorité à la cohorte 2A.

Cohorte 3 : total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe, dont un individu par portée, si possible). Il pourra y avoir lieu d'utiliser des petits supplémentaires issus du groupe témoin, qui serviront de témoins positifs pour l'essai de réponse anticorps dépendante des lymphocytes T, au JPN 56 ± 3 .

35. Si l'une des portées ne compte pas suffisamment de petits pour toutes les cohortes, ils sont affectés en priorité à la cohorte 1, qui peut ensuite servir à produire une génération F2. Il est possible d'affecter davantage de petits à l'une des cohortes en cas de préoccupations spécifiques, par exemple quand un produit chimique est présumé neurotoxique, immunotoxique ou reprotoxique. Ces petits pourront servir à des examens menés à des moments différents ou pour l'évaluation d'effets supplémentaires. Les petits non affectés aux cohortes feront l'objet d'un examen biochimique clinique (paragraphe 56) et d'une nécropsie macroscopique (paragraphe 69).

Second accouplement des animaux P

36. On déconseille généralement de procéder à un second accouplement des animaux P, ce qui entraînerait la perte d'informations importantes sur le nombre de points d'implantation (et donc de données post-implantation et périnatales, indicatrices d'une éventuelle action tératogène) concernant la première portée. S'il y a lieu de vérifier ou d'élucider un effet chez les femelles exposées, il est préférable d'étendre l'étude à un accouplement de la génération F1. Cependant, il est toujours possible de procéder à un second accouplement des mâles P avec des femelles non traitées afin de clarifier les résultats équivoques ou pour mieux caractériser les effets sur la fertilité observés à la suite du premier accouplement.

OBSERVATIONS IN VIVO

Observations cliniques

37. Les animaux P et F1 sélectionnés font l'objet d'une observation clinique générale quotidienne. Si l'administration se fait par gavage, ces observations cliniques auront lieu avant et après le traitement (à la recherche d'éventuels signes de toxicité associés aux pics de concentration plasmatique). On note les changements de comportement pertinents, les signes de mise-bas prolongée ou difficile et tous les signes de toxicité. Deux fois par jour, ou une fois par jour pendant le week-end, on surveille les manifestations de toxicité sévère, la morbidité et la mortalité sur l'ensemble des animaux.

38. En outre, tous les individus P et F1 (après le sevrage) font l'objet une fois par semaine d'un examen plus détaillé, qu'il sera commode d'effectuer à l'occasion d'une pesée de l'animal, ce qui limitera le stress lié à la manipulation. Les observations sont effectuées avec soin et consignées conformément aux systèmes de cotation définis par le laboratoire d'essai. On s'attache particulièrement à réduire au minimum les variations affectant les conditions de l'essai. Les observations notées portent, sans que cette liste soit exhaustive, sur les modifications de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, sur l'apparition de sécrétions et d'excrétions et sur les activités réflexes (par exemple larmes, érection des poils, diamètre de la pupille, rythme respiratoire inhabituel). Il convient également de noter tout changement dans la démarche ou la posture, les

réactions à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypes (par exemple toilettage excessif, circuits répétitifs) ou de comportements bizarres (par exemple automutilation, marche à reculons).

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

39. Les animaux P sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. En outre, les femelles P sont pesées pendant l'allaitement, les mêmes jours que la pesée des petits de leurs portées (voir paragraphe 45). Tous les animaux F1 sont pesés individuellement au moment du sevrage (JPN 21) et au moins chaque semaine par la suite. On relève aussi le poids corporel des animaux le jour où ils atteignent la puberté (séparation préputiale ou ouverture vaginale observables). Tous les animaux sont pesés au moment du sacrifice.

40. Au cours de l'étude, la consommation de nourriture et d'eau (si le produit chimique testé est administrée dans l'eau de boisson) est consignée au moins une fois par semaine, le même jour que la pesée des animaux (sauf pendant la cohabitation). La consommation de nourriture de chaque cage d'animaux F1 est notée une fois par semaine, dès l'affectation à une cohorte particulière.

Cycles œstraux

41. Les éventuelles informations préliminaires concernant les effets du produit chimique testé sur le cycle œstral, fournies par de précédentes études de toxicité à doses répétées, pourront être mises à profit pour élaborer un protocole d'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération propre au produit chimique concerné. Normalement, l'évaluation de la cyclicité œstrale (par cytologie vaginale) commence au début de la période de traitement et se poursuit jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré ou jusqu'à la fin de la période d'accouplement de deux semaines. Si l'on a vérifié la normalité des cycles œstraux des femelles avant d'administrer le produit chimique testé, il est utile de poursuivre les frottis quand le traitement démarre, mais si l'on craint des effets non spécifiques au démarrage du traitement (par exemple une baisse marquée de la consommation de nourriture), on pourra laisser les animaux s'adapter au traitement pendant deux semaines maximum avant la période d'observation des frottis (de deux semaines) qui précède la période d'accouplement. Si l'on prolonge ainsi la période de traitement des femelles (ce qui porte à 4 semaines le traitement avant accouplement), on pourra envisager d'acheter les animaux plus jeunes et de rallonger aussi la période de traitement des mâles avant la mise en couple. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (10) (11).

42. Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour pour l'ensemble des femelles F1 de la cohorte 1A, à partir de l'ouverture du vagin jusqu'à l'observation des premières cellules kératinisées, afin de déterminer l'intervalle de temps entre ces deux événements. Il convient également de suivre les cycles œstraux de toutes les femelles F1 de la cohorte 1A pendant deux semaines, à partir du 75^{ème} jour postnatal environ. En outre, si l'accouplement de la génération F1 s'impose, la cytologie vaginale des femelles de la cohorte 1B se poursuivra depuis la mise en couple jusqu'à ce que la copulation ait eu lieu.

Accouplement et gravidité

43. Outre les paramètres standard (par exemple, poids corporel, consommation de nourriture, observations cliniques dont contrôle de la mortalité/morbidité), on relève les

dates de mise en couple, d'insémination et de mise-bas, et on calcule l'intervalle précoïtal (entre la mise en couple et l'insémination) et la durée de la gestation (entre l'insémination et la mise-bas). Il convient d'examiner minutieusement les femelles P au moment prévu pour la mise-bas afin de repérer d'éventuels symptômes de dystocie. Toute anomalie du comportement de nidification ou d'allaitement devra être relevée.

44. Le jour de la parturition correspond au jour 0 de l'allaitement pour la mère, et au jour postnatal 0 (JPN 0) pour la descendance. Il est aussi possible de compter les jours à partir de la copulation pour éviter les erreurs sur les données relatives au développement postnatal dues aux différences de durée de gestation ; il convient toutefois de noter également les jours à partir de la mise-bas. Ce changement de référence est particulièrement important lorsque le produit chimique testé influence la durée de la gestation.

Caractéristiques de la descendance

45. On examine chaque portée dès que possible après la mise-bas (JPN 0 ou 1) afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortinatalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques (anomalies externes visibles, y compris : fentes palatines ; hémorragies sous-cutanées ; anomalies de la couleur ou de la texture de la peau ; présence du cordon ombilical ; absence de lait dans l'estomac ; présence de sécrétions séchées). De plus, le premier examen clinique des nouveau-nés est l'occasion d'effectuer une évaluation qualitative de la température corporelle, du degré d'activité et de la réaction à la manipulation. Chez les petits morts à JPN 0 ou plus tard, on recherche d'éventuelles anomalies et la cause du décès. Les petits en vie sont comptés et pesés individuellement à JPN 0 ou JPN 1, puis régulièrement, par exemple au moins aux JPN 4, 7, 14 et 21. Les examens cliniques, qui dépendent de l'âge des animaux, sont répétés à chaque pesée des descendants, voire plus souvent si des cas spécifiques ont été révélés au moment de la naissance. Les symptômes à surveiller sont notamment les suivants (liste non exhaustive) : anomalies externes, modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives. Il convient également de noter tout changement dans la démarche ou la posture, les réactions à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypies ou de comportements bizarres.

46. On mesure la distance anogénitale (DAG) de chaque petit au moins une fois entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG, qui est rapportée à la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (12). On recherche la présence de tétons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13.

47. On commence à surveiller quotidiennement les signes de séparation balano-préputiale ou d'ouverture vaginale sur tous les animaux F1 avant le jour prévu d'apparition de ces signes, afin de détecter une éventuelle maturation sexuelle précoce. Toute anomalie persistante des organes génitaux, telle que filaments vaginaux, hypospadias ou pénis bifide est notée. La maturité sexuelle des animaux F1 est comparée au développement physique en déterminant l'âge et le poids corporel au moment de la séparation balano-préputiale ou de l'ouverture vaginale chez le mâle/la femelle, respectivement (13).

Évaluation du potentiel de neurotoxicité pour le développement (cohortes 2A et 2B)

48. L'évaluation de la neurotoxicité s'appuie sur les individus des cohortes 2A et 2B, qui comptent chacune dix mâles et dix femelles issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée ; chaque portée représentée par au moins un petit ; sélection au hasard). Les animaux de la cohorte 2A seront soumis à une batterie d'observations fonctionnelles, à une évaluation du réflexe de sursaut auditif, de l'activité motrice (voir paragraphes 49-51) et à une évaluation neuropathologique (voir paragraphes 75-76). On s'attachera particulièrement à réduire au minimum les variations affectant l'ensemble des conditions de l'essai et à s'assurer qu'elles ne sont pas systématiquement liées au traitement. Parmi les variables susceptibles de jouer sur le comportement figurent le niveau sonore (par exemple bruits intermittents), la température, l'humidité, l'éclairage, les odeurs, l'heure du jour et les distractions liées à l'environnement extérieur. Il convient d'interpréter les résultats des essais de neurotoxicité en fonction des ordres de grandeur de référence appropriés provenant des groupes témoins historiques. L'évaluation neuropathologique des animaux de la cohorte 2B aura lieu aux JPN 21 ou 22 (voir paragraphes 75-76).

49. On testera le réflexe de sursaut auditif des animaux de la cohorte 2A au JPN 24 (± 1 jour). L'évaluation des groupes traités et témoins est répartie de manière équilibrée au cours de la journée. Chaque session comporte 50 essais. Pour ces tests de sursaut auditif, on calculera l'amplitude de la réponse moyenne pour chaque bloc de 10 essais (5 blocs de 10 essais), dont les conditions sont optimisées pour permettre une accoutumance intra-session. Ces protocoles sont conformes à la LD 426 de l'OCDE (35).

50. À un moment approprié entre les JPN 63 et 75, les animaux de la cohorte 2A sont soumis à la batterie d'observations fonctionnelles ainsi qu'à un test automatisé de motricité. Ces procédures sont conformes aux LD 424 (33) et 426 (35) de l'OCDE. La batterie d'observations fonctionnelles comprend une description complète de l'apparence, du comportement et de l'intégrité fonctionnelle du sujet. Ces évaluations sont basées sur des observations effectuées dans la cage d'hébergement puis dans un espace d'observation normalisé (plan ouvert) où l'animal peut se déplacer librement, et sur des tests de manipulation. On procédera aux essais par ordre d'interactivité croissante. Une liste de mesures est présentée à l'appendice A. Tous les animaux sont examinés soigneusement par des observateurs formés à cet effet et ignorant le traitement reçu par l'animal, suivant des protocoles normalisés destinés à limiter la variabilité liée à l'observateur. Dans la mesure du possible, il est recommandé de confier au même observateur l'évaluation de tous les animaux d'un test donné. À défaut, il convient de démontrer la fiabilité inter-observateurs. Pour chaque paramètre de la batterie de tests comportementaux, il faudra se référer à des échelles et des critères de cotation dont les modes opératoires sont définis explicitement. Si possible, des mesures quantitatives objectives sont effectuées pour les observations impliquant une cotation subjective. Concernant l'activité motrice, chaque animal est testé individuellement. La séance d'essai dure assez longtemps pour permettre de démontrer l'accoutumance intra-session des témoins. L'activité motrice est contrôlée à l'aide d'un appareil d'enregistrement automatique capable de détecter aussi bien des augmentations que des diminutions d'activité (c'est-à-dire que l'activité de base mesurée par le dispositif ne doit pas être trop faible, ce qui empêcherait la détection des diminutions d'activité, ni trop forte, ce qui empêcherait la détection d'augmentations). Tous les appareils sont testés selon des protocoles standard afin de garantir, dans la mesure du possible, la reproductibilité entre appareils et entre dates de mesure. Il convient d'équilibrer au mieux les groupes de

traitement affectés à chaque appareil. Les groupes d'évaluation de l'essai sont répartis sur la journée pour tenir compte des rythmes d'activité circadiens.

51. S'il existe des informations indiquant que d'autres essais fonctionnels s'imposent (par exemple sensoriels, sociaux, cognitifs), ces essais seront inclus dans le protocole de l'étude sans compromettre l'intégrité des autres évaluations prévues. Si ces autres essais portent sur les mêmes animaux que ceux soumis au test du sursaut auditif, à la batterie d'observations fonctionnelles et au test de motricité, il convient de les programmer à des moments différents pour limiter le risque de perturbation. Des protocoles supplémentaires peuvent se révéler particulièrement utiles lorsque l'observation empirique, les effets anticipés ou divers aspects liés au mécanisme ou au mode d'action suggèrent un type spécifique de neurotoxicité.

Évaluation du potentiel d'immunotoxicité pour le développement (cohorte 3)

52. Au JPN 56 (± 3 jours), 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 3 issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée ; chaque portée représentée par au moins un petit ; sélection au hasard) seront soumis à un essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T, à la recherche d'anticorps IgM produits au cours de la réponse primaire à un antigène dépendant des lymphocytes T, par exemple les globules rouges de mouton (GRM) ou l'hémocyanine de patelle (KLH) ; ces essais seront conformes aux protocoles actuels d'étude de l'immunotoxicité (14) (15). La réponse peut être évaluée par comptage des cellules formatrices de plaques (CFP) spécifiques dans la rate ou par titrage sérique des anticorps IgM spécifiques aux GRM ou à la KLH par ELISA, au moment du pic de réponse. En général, les réponses atteignent un pic quatre jours (pour le comptage des CFP) ou cinq jours (par ELISA) après l'immunisation par voie intraveineuse. Si la réponse primaire des anticorps est évaluée par comptage des CFP, il est permis de répartir les animaux en sous-groupes évalués à des jours différents, aux conditions suivantes : l'intervalle entre l'immunisation et le sacrifice d'un sous-groupe est défini de manière à ce que les CFP soient comptés au moment du pic de la réponse ; les sous-groupes contiennent le même nombre de descendants mâles et femelles issus de tous les groupes de dose, y compris les témoins ; et les sous-groupes sont examinés à peu près au même âge postnatal. On continuera d'administrer le produit chimique testé jusqu'au jour qui précède le prélèvement de la rate des animaux pour l'évaluation de la réponse des CFP ou du sérum pour l'essai ELISA.

Évaluation ultérieure du potentiel de reprotoxicité (cohorte 1B)

53. On peut continuer d'administrer le traitement aux animaux de la cohorte 1B au-delà du JPN 90, et les élever pour produire une génération F2 si nécessaire. Les mâles et les femelles d'un même groupe de dose cohabitent (en évitant d'accoupler les membres d'une même fratrie) pour une durée allant jusqu'à deux semaines, à partir du JPN 90 ou après, mais pas au-delà du JPN 120. Les protocoles sont les mêmes que pour les animaux P. Cependant, sur la base du poids de la preuve, il peut s'avérer suffisant de sacrifier les portées au JPN 4 au lieu de les évaluer jusqu'au sevrage ou au-delà.

OBSERVATIONS FINALES

Biochimie clinique/hématologie

54. On surveillera les effets systémiques chez les animaux P. Des échantillons sanguins sont prélevés à jeun sur un site défini chez dix mâles et femelles P par groupe de

dose, sélectionnés au hasard au moment du sacrifice. Ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées et font l'objet d'un examen hématologique partiel ou complet, d'un examen biochimique clinique, d'un dosage de T4 et TSH, ou d'autres examens suggérés par la connaissance du profil d'effets du produit chimique testé chimique testé (voir document d'orientation 151 (40)). Il convient d'évaluer les paramètres hématologiques suivants : hémocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, numération totale et différentielle des leucocytes, numération des plaquettes et mesure du temps et du potentiel de coagulation du sang. Dans le plasma ou le sérum, on mesure les éléments suivants : glucose, cholestérol total, urée, créatinine, protéines totales, albumine et au moins deux enzymes indicatrices d'effets sur les cellules hépatiques (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyl transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Dans certains cas, le dosage d'enzymes supplémentaires et des acides biliaires peut livrer des informations utiles. En outre, il est possible de conserver des prélèvements sanguins de tous les animaux en vue d'une éventuelle analyse ultérieure destinée à clarifier les effets équivoques ou générer des données d'exposition interne. S'il n'est pas prévu de procéder à un second accouplement, les échantillons sont prélevés dans le cadre du sacrifice programmé ou juste avant. Lorsque les animaux sont maintenus en vie, les prélèvements ont lieu quelques jours avant le second accouplement. Par ailleurs, à moins que des études à doses répétées antérieures indiquent que le produit chimique testé n'influe pas sur ce paramètre, il convient de procéder à une analyse d'urine avant le sacrifice, en évaluant les critères suivants : apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et globules rouges, débris cellulaires. Des prélèvements d'urine peuvent également être effectués afin de suivre l'excrétion du produit chimique testé chimique testé et/ou de son ou ses métabolites.

55. On surveillera aussi les effets systémiques chez les animaux F1. Des échantillons sanguins sont prélevés à jeun sur un site défini chez dix mâles et femelles de la cohorte 1A par groupe de dose, sélectionnés au hasard au moment du sacrifice. Ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées et font l'objet d'un examen biochimique clinique standard, et notamment d'une mesure de la concentration sérique des hormones thyroïdiennes (T4 et TSH), d'un examen hématologique (numération totale et différentielle des leucocytes plus érythrocytes) et d'une analyse d'urine.

56. Les petits surnuméraires au JPN 4 font l'objet d'une nécropsie macroscopique et on peut mesurer la concentration sérique de l'hormone thyroïdienne T4 à cette occasion. Si nécessaire, les échantillons sanguins des nouveau-nés (JPN 4) peuvent être regroupés par portée aux fins d'analyses biochimiques et du dosage d'hormones thyroïdiennes. Des échantillons sanguins sont également prélevés sur les sujets tout juste sevrés soumis à une nécropsie macroscopique au JPN 22 (petits F1 non sélectionnés pour les cohortes), afin de doser la T4 et la TSH.

Caractéristiques du sperme

57. On détermine les caractéristiques du sperme pour tous les mâles de la génération P, sauf s'il existe des données montrant que ces caractéristiques ne sont pas modifiées au cours d'une étude sur 90 jours. Les caractéristiques du sperme ne sont évaluées que chez les mâles de la cohorte 1A.

58. Au moment du sacrifice, on note le poids des testicules et des épидидymes de tous les mâles P et F1 (cohorte 1A). On conserve au moins un testicule et un épидидyme pour l'examen histopathologique. L'épидидyme non conservé sert à la numération des

spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme (16) (17). Les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (ou du canal déférent) sont par ailleurs récupérés d'une manière qui perturbe le moins possible l'évaluation de leur motilité et de leur morphologie (18).

59. La motilité des spermatozoïdes est évaluée immédiatement après le sacrifice ou enregistrée en vidéo en vue d'une analyse ultérieure. Le pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles peut être déterminé subjectivement ou objectivement grâce une analyse du mouvement assistée par ordinateur (19) (20) (21) (22) (23) (24). On conduira l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes à partir d'échantillons de sperme prélevés dans l'épididyme (ou le canal déférent) sous forme de préparations fixées ou en milieu humide (25). Au moins 200 spermatozoïdes par échantillon sont classés comme normaux (aussi bien la tête que la pièce intermédiaire et le flagelle paraissent normaux) ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées (26). Des têtes déformées ou larges peuvent indiquer des anomalies de la spermiation.

60. Si les échantillons de sperme sont congelés, les frottis fixés et les images de la motilité des spermatozoïdes enregistrées au moment de la nécropsie (27), les analyses ultérieures peuvent ne porter que sur les mâles ayant reçu des doses élevées et sur les mâles témoins. Toutefois, si l'on observe des effets liés au traitement, il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles.

Nécropsie macroscopique

61. Juste après le sacrifice ou le décès en cours d'étude, tous les animaux P et F1 subissent une nécropsie macroscopique destinée à mettre en évidence d'éventuelles anomalies structurelles ou altérations pathologiques. Il faut prêter une attention particulière aux organes de l'appareil reproducteur. Il convient de consigner les petits moribonds qui ont été euthanasiés et les petits morts, et, s'ils ne sont pas macérés, de les examiner pour détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de leur mort, et de les conserver.

62. Un frottis vaginal des femelles P et F1 adultes sera examiné le jour de la nécropsie pour déterminer le stade du cycle œstral et permettre d'établir des corrélations avec l'histopathologie des organes reproducteurs. On examinera les utérus de toutes les femelles P (et F1, le cas échéant) sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

Pesée des organes et conservation des tissus – animaux adultes P et F1

63. Après le sacrifice, le poids corporel et le poids des organes énumérés ci-dessous de tous les animaux P et F1 adultes des cohortes concernées (voir ci-après) sont déterminés dès que possible après dissection pour éviter toute dessiccation. Il convient de préserver ensuite ces organes dans des conditions appropriées. Sauf mention contraire, les organes qui vont par paires peuvent être pesés individuellement ou ensemble, conformément aux habitudes du laboratoire.

- Utérus (dont oviductes et col), ovaires
- Testicules, épидидymes (totalité et queue pour les échantillons servant à la numération des spermatozoïdes)
- Prostate (ensemble des parties dorsolatérale et ventrale). Il convient d'extraire très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate pour éviter de

percer les vésicules séminales remplies de liquide. Si le traitement a eu un effet sur le poids total de la prostate, on disséquera minutieusement les lobes dorsolatéral et ventral après les avoir fixés et pesés séparément.

- Vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides (considérés comme une unité et pesés ensemble)
- Cerveau, foie, reins, cœur, rate, thymus, hypophyse, glande thyroïde (après fixation), glandes surrénales et organes ou tissus cibles connus.

64. Outre les organes mentionnés ci-dessus, on conservera, dans des conditions appropriées, des échantillons de nerf périphérique, muscle, colonne vertébrale, œil avec nerf optique, conduit gastro-intestinal, vessie, poumon, trachée (portant encore les glandes thyroïde et parathyroïdes), moelle osseuse, canal déférent (mâles), glandes mammaires (mâles et femelles) et vagin.

65. Tous les organes des animaux de la cohorte 1A sont pesés et conservés en vue de l'examen histopathologique.

66. Pour rechercher les effets immunotoxiques pré- et postnataux, 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 1A issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée ; chaque portée représentée par au moins un petit ; sélection au hasard) seront soumis aux examens suivants au moment du sacrifice :

- pesée des ganglions lymphatiques associés ou non à la voie d'exposition (en plus de la pesée des glandes surrénales, du thymus et de la rate, déjà effectuée pour tous les animaux de la cohorte 1A) ;
- analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques (lymphocytes T CD4+ et CD8+, lymphocytes B, et cellules tueuses naturelles NK) effectuée sur la moitié de la rate, l'autre moitié étant conservée en vue de l'examen histopathologique.

L'analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques chez les animaux non immunisés (cohorte 1A) déterminera si l'exposition contribue à une modification de l'équilibre immunologique concernant la distribution des lymphocytes thymiques « auxiliaires » (CD4+) ou cytotoxiques (CD8+) ou des cellules tueuses naturelles (NK) (réponses rapides aux cellules néoplastiques et aux pathogènes).

67. Il convient de peser les organes suivants des animaux de la cohorte 1B et de traiter leurs tissus jusqu'à leur transformation en blocs :

- Vagin (non pesé)
- Utérus (dont col)
- Ovaires
- Testicules (au moins un)
- Épидidymes
- Vésicules séminales et glandes coagulantes
- Prostate
- Hypophyse
- Organes cibles connus

L'examen histopathologique de la cohorte 1B ne sera conduit que si les résultats de la cohorte 1A sont équivoques ou si la substance administrée est présumée toxique pour la reproduction ou le système endocrinien.

68. Cohortes 2A et 2B : essai de neurotoxicité pour le développement (JPN 21 ou 22 et descendants adultes). Les animaux de la cohorte 2A sont sacrifiés après l'essai comportemental ; leur cerveau est ensuite pesé et soumis à un examen neurohistopathologique complet à des fins d'évaluation de la neurotoxicité. Les animaux de la cohorte 2B sont sacrifiés au JPN 21 ou 22 ; leur cerveau est ensuite pesé et soumis à un examen microscopique pour évaluer la neurotoxicité. La fixation par perfusion est indispensable pour les animaux de la cohorte 2A et facultative pour ceux de la cohorte 2B, conformément à la LD 426 de l'OCDE (35).

Pesée des organes et conservation des tissus – animaux F1 juste sevrés

69. Les petits non sélectionnés pour les cohortes, y compris les individus chétifs, sont sacrifiés après le sevrage, au JPN 22, sauf si les résultats indiquent que d'autres recherches *in vivo* s'imposent. Les petits euthanasiés sont soumis à une nécropsie macroscopique comprenant l'évaluation des organes reproducteurs, conformément aux paragraphes 63 et 64. Le cerveau, la rate et le thymus sont pesés et conservés dans des conditions appropriées pour un nombre maximum de 10 petits par sexe et par groupe, issus d'autant de portées que possible. De plus, on pourra conserver les tissus mammaires de ces petits mâles et femelles en vue d'analyses microscopiques supplémentaires (voir document d'orientation 151 (40)). On conservera également les anomalies macroscopiques et les tissus cibles en vue d'un éventuel examen histologique.

Histopathologie – animaux P

70. Un examen histopathologique complet des organes énumérés aux paragraphes 63 et 64 est pratiqué sur l'ensemble des animaux P témoins ou ayant reçu une dose élevée. Il convient aussi d'examiner les organes qui présentent des modifications imputables à la substance chimique testée chez tous les animaux traités avec des doses inférieures en vue de définir une CSENO. En outre, un examen histopathologique des organes reproducteurs et de toutes les lésions macroscopiques sera pratiqué sur tous les individus chez lesquels on soupçonne une diminution de la fertilité, par exemple ceux qui ne se sont pas accouplés, n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains, ou dont le cycle œstral ou le nombre, la motilité ou la morphologie des spermatozoïdes ont été affectés.

Histopathologie – animaux F1

Animaux de la cohorte 1

71. Un examen histopathologique complet des organes énumérés aux paragraphes 63 et 64 est pratiqué sur l'ensemble des animaux adultes de la cohorte 1A témoins ou ayant reçu une dose élevée. Chaque portée est représentée par au moins un petit de chaque sexe. Il convient aussi d'examiner les organes et les tissus qui présentent des modifications imputables au traitement, ainsi que toutes les lésions macroscopiques, chez tous les animaux traités aux doses inférieures en vue de déterminer une CSENO. L'évaluation des effets pré- et postnataux sur les ganglions lymphatiques requiert un examen histopathologique des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse pratiqué sur 10

mâles et 10 femelles de la cohorte 1A, en plus de l'examen histopathologique du thymus, de la rate et des glandes surrénales déjà effectué sur tous les animaux 1A.

72. Les tissus reproducteurs et endocriniens de l'ensemble des individus de la cohorte 1B sont traités pour être transformés en blocs. Comme mentionné au paragraphe 67, les organes reproducteurs et endocriniens des animaux de la cohorte 1B subissent un examen histopathologique en cas de suspicion de toxicité pour la reproduction ou le système endocrinien. Il convient aussi de soumettre la cohorte 1B à un examen histologique si les résultats de la cohorte 1A sont équivoques.

73. Les ovaires des femelles adultes doivent contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance, ainsi que les grands corps jaunes ; l'examen histopathologique des femelles F1 vise donc à quantifier les follicules primordiaux, les petits follicules en croissance et les grands corps jaunes ; il convient que le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de section soient statistiquement appropriés à la méthode d'évaluation employée. Il est possible de procéder d'abord à la numération folliculaire des animaux témoins et traités à la dose élevée ; si l'examen de ces derniers révèle un effet nocif, on étendra l'évaluation aux individus ayant reçu les doses inférieures. L'examen inclut la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, à des fins de comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins (voir document d'orientation 151 (40)). L'évaluation des grands corps jaunes s'effectue parallèlement à l'essai de cyclicité œstrale de sorte que l'étape du cycle puisse être prise en compte. On vérifiera le développement spécifique correct des oviductes, de l'utérus et du vagin.

74. Un examen histopathologique détaillé des testicules sera pratiqué sur les mâles F1 afin de mettre en évidence des effets liés au traitement sur la différenciation et le développement des testicules, et sur la spermatogenèse (38). Quand c'est possible, des coupes du rete testis seront examinées. On vérifiera le développement spécifique normal de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme ainsi que du canal déférent, et on évaluera les paramètres requis pour les mâles P.

Animaux de la cohorte 2

75. Un examen neurohistopathologique est pratiqué sur tous les animaux de la cohorte 2A témoins et traités à dose élevée, par sexe, juste après le test neurocomportemental (après le JPN 75, mais pas au-delà du JPN 90). L'examen histopathologique du cerveau est effectué sur tous les animaux de la cohorte 2B témoins et traités à dose élevée, par sexe, au JPN 21 ou 22. Il convient aussi d'examiner les organes ou tissus qui présentent des modifications imputables à le produit chimique testé chez les animaux traités avec des doses inférieures en vue de déterminer une CSENO. Pour les animaux des cohortes 2A et 2B, plusieurs coupes du cerveau sont réalisées afin d'examiner les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe, les ganglions de la base, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale (tectum, tegmentum et pédoncules cérébraux), le tronc cérébral et le cervelet. Seule la cohorte 2A subira par ailleurs un examen des yeux (rétine et nerf optique) et d'échantillons de nerf périphérique, muscle et colonne vertébrale. Tous les protocoles neurohistologiques sont conformes à la LD 426 de l'OCDE (35).

76. Des parties représentatives du cerveau (coupes homologues soigneusement sélectionnées grâce à des repères microscopiques fiables) seront soumises à un examen morphométrique (quantitatif), qui pourra inclure des mesures linéaires et/ou surfaciques de régions spécifiques du cerveau. On réalisera au moins trois coupes consécutives pour

chaque repère morphologique (niveau) en vue de sélectionner ensuite la coupe la plus homologue et représentative de la région spécifique du cerveau à analyser. Les neuropathologistes devront juger si les coupes préparées pour les mesures sont homologues aux autres échantillons du lot et si elles peuvent donc être examinées, dans la mesure où les mesures linéaires, en particulier, sont susceptibles de changer sur une distance relativement faible (28). Les coupes jugées non homologues sont exclues. L'objectif est de prélever des échantillons sur tous les animaux réservés à cet effet (10/sexe/niveau de dose), mais un nombre inférieur demeure acceptable. Toutefois, des échantillons prélevés sur moins de 6 animaux/sexe/niveau de dose ne seront en principe pas considérés comme suffisants pour répondre aux objectifs de la présente LD. La stéréologie peut permettre d'identifier des effets liés au traitement sur des paramètres tels que le volume ou le nombre de cellules de régions neuroanatomiques spécifiques. Tous les aspects de la préparation des échantillons de tissus, depuis la fixation de tissus jusqu'à la dissection des échantillons de tissus, au traitement des tissus et à la coloration des lames, devront se conformer à un modèle expérimental équilibré tel que chaque lot contienne des échantillons représentatifs de chaque groupe de dose. En cas de recours aux analyses morphométriques ou stéréologiques, les tissus cérébraux sont inclus dans un milieu approprié, simultanément pour toutes les doses, afin d'éviter les artefacts de rétrécissement associés à un stockage prolongé dans le fixateur.

RAPPORT

Résultats

77. Les résultats sont rapportés individuellement et résumés sous forme de tableaux. S'il y a lieu, on présentera les informations suivantes pour chaque groupe d'essai et chaque génération : nombre d'animaux présents au début de l'essai, nombre d'animaux décédés durant l'essai ou euthanasiés, moment du décès ou de l'euthanasie, nombre d'animaux fertiles, nombre de femelles gravides, nombre de femelles donnant naissance à une portée, et nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité. Le rapport contient aussi une description de la toxicité, y compris le moment d'apparition des effets toxiques, leur durée et leur sévérité.

78. On évaluera les résultats numériques à l'aide d'une méthode statistique appropriée et acceptée. Les méthodes statistiques font partie intégrante de la méthodologie de l'essai et sont choisies comme telles ; elles traitent de façon pertinente les données non normales (par exemple les résultats des numérations), les données tronquées (par exemple en raison d'un temps d'observation limité), la non-indépendance (par exemple les effets sur les portées et les mesures répétées) et les variances inégales. Les modèles linéaires généralisés mixtes et les modèles dose-effet couvrent un large éventail d'outils d'analyse qui peuvent convenir au traitement des résultats dans le cadre de cette LD. Le rapport fournit suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puissent évaluer/ré-évaluer l'analyse.

Évaluation des résultats

79. Les résultats sont évalués en fonction des effets observés, notamment à la nécropsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation porte notamment sur la relation ou l'absence de relation entre la dose et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment des lésions macroscopiques. Elle porte aussi sur les organes cibles, la fertilité, les anomalies cliniques, la capacité reproductrice et les portées, les modifications du poids corporel, la mortalité et autres effets toxiques et affectant le

développement. Les modifications spécifiques à chaque sexe font l'objet d'une attention particulière. Les propriétés physico-chimiques du produit chimique testé chimique testé et, le cas échéant, les données toxicocinétiques, y compris le transfert dans le placenta et l'excrétion dans le lait, sont prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

Rapport d'essai

80. Le rapport d'essai comporte les informations énumérées ci-après, obtenues dans la présente étude à partir des animaux P, F1 et F2 (le cas échéant) :

Substance d'essai :

- Toutes les informations pertinentes disponibles concernant le produit chimique testé et ses propriétés toxicocinétiques et toxicodynamiques ;
- Données d'identification ;
- Pureté.

Véhicule (s'il y a lieu) :

- Justification du choix du véhicule s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai :

- Espèces/souches utilisées ;
- Nombre, âge et sexe ;
- Source, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc. ;
- Poids de chaque animal au début de l'essai ;
- Résultats des frottis vaginaux des femelles P avant le début du traitement (si ces examens ont été pratiqués à ce moment-là) ;
- Données sur l'accouplement de la génération P, précisant les partenaires mâles et femelles du couple, et le succès de l'accouplement ;
- Portée d'origine des adultes de la génération F1.

Conditions d'essai :

- Justification de la sélection des doses appliquées ;
- Détails concernant la préparation du produit chimique testé chimique testé ou son incorporation aux aliments, ainsi que la concentration obtenue ;
- Stabilité et homogénéité de la préparation dans le véhicule ou le milieu d'administration (par exemple la nourriture, l'eau de boisson), dans le sang et/ou le lait, dans les conditions d'utilisation et de stockage entre les utilisations ;
- Détails sur l'administration du produit chimique testé chimique testé ;
- Conversion de la concentration du produit chimique testé chimique testé (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu ;

- Détails concernant la qualité des aliments et de l'eau (y compris la composition de la nourriture, si possible) ;
- Description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, et pour affecter les petits aux groupes d'essai ;
- Conditions environnementales;
- Liste du personnel impliqué dans l'étude, mentionnant leur formation professionnelle.

Résultats (récapitulatif et données individuelles par sexe et par dose) :

- Consommation de nourriture, consommation d'eau (si disponible), efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme de nourriture consommé, sauf lors de la cohabitation et de l'allaitement), et consommation du produit chimique testé chimique testé (en cas d'administration dans la nourriture/l'eau de boisson) pour les animaux P et F1 ;
- Données relatives à l'absorption (si disponibles) ;
- Poids corporel des animaux P ;
- Poids corporel des animaux F1 sélectionnés juste après le sevrage ;
- Temps de survie pendant l'étude ou indication de la survie des animaux à la fin de l'expérience ;
- Nature, sévérité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non) ;
- Résultats des analyses hématologique, d'urine et de chimie clinique, y compris dosage des TSH et T4 ;
- Analyse phénotypique des cellules spléniques (lymphocytes T, B, cellules NK) ;
- Cellularité de la moelle osseuse ;
- Données sur les effets toxiques ;
- Nombre de femelles P et F1 présentant une durée de cycle ou un cycle œstral normal ou anormal ;
- Moment de la copulation (intervalle précoïtal, soit nombre de jours entre l'accouplement et la copulation) ;
- Effets toxiques ou autres sur la reproduction, y compris nombre et pourcentage d'animaux qui ont copulé, sont gravides, ont mis bas et allaité, de mâles déclenchant une gravidité, de femelles présentant des signes de dystocie ou de mise-bas prolongée ou difficile ;
- Durée de la gestation et, lorsque c'est possible, de la parturition ;
- Nombre d'implantations, taille de la portée et pourcentage de petits mâles ;
- Nombre et pourcentage de pertes post-implantation, de naissances vivantes et de mort-nés ;
- Poids des portées et poids des petits (mâles, femelles et poids global), nombre d'individus chétifs, s'il est établi ;

- Nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques ;
- Effets toxiques ou autres sur la descendance, la croissance postnatale, la viabilité, etc. ;
- Repères physiques relevés sur les petits et autres données sur le développement postnatal ;
- Informations relatives à la maturité sexuelle des animaux F1 ;
- Observations fonctionnelles réalisées selon les besoins sur les petits et les adultes ;
- Poids corporel au moment du sacrifice, et poids absolu et relatif des organes des adultes P et F1 ;
- Résultats de la nécropsie ;
- Description détaillée de toutes les observations histopathologiques ;
- Nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles, pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale, et pourcentage de spermatozoïdes correspondant à chaque anomalie identifiée pour les mâles P et F1 ;
- Nombre et stades de maturation des follicules contenus dans les ovaires des femelles P et F1, le cas échéant ;
- Numération des grands corps jaunes dans les ovaires des femelles F1 ;
- Traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Paramètres de la cohorte 2 :

- Description détaillée des protocoles utilisés pour standardiser les observations et les protocoles, et définitions du mode opératoire de notation des observations ;
- Liste de tous les protocoles d'essai utilisés, et justification de leur choix ;
- Précisions sur les protocoles comportementaux/fonctionnels, neuropathologiques et morphométriques utilisés, y compris informations et détails concernant les appareils automatisés ;
- Protocoles d'étalonnage et de vérification de l'équivalence des appareils et de la répartition équilibrée des groupes de traitement dans les protocoles d'essai ;
- Brève justification explicitant les éventuelles décisions impliquant une appréciation professionnelle ;
- Description détaillée de toutes les observations comportementales/fonctionnelles, neuropathologiques et morphométriques par sexe et par groupe de dose, y compris augmentations et diminutions par rapport aux témoins ;
- Poids du cerveau ;
- Tout diagnostic, réalisé sur la base de signes et de lésions neurologiques, y compris maladies ou affections d'origine naturelle ;
- Images d'observations représentatives ;

- Images à faible grossissement permettant d'évaluer l'homologie des coupes utilisées pour la morphométrie ;
- Traitement statistique des résultats, notamment modèles statistiques employés pour analyser les données, et résultats, qu'ils soient significatifs ou non ;
- Lien entre chaque effet toxique et la conclusion proposée sur le potentiel neurotoxique du produit chimique de l'essai, par sexe et par groupe de dose ;
- Répercussions de toutes les informations toxicocinétiques sur les conclusions ;
- Données démontrant la fiabilité et la sensibilité de la méthode de l'essai (c'est-à-dire, résultats des témoins positifs et historiques) ;
- Relations éventuelles entre les effets neuropathologiques et fonctionnels ;
- CSENO ou dose de référence pour les mères et les petits, par sexe et groupe de dose ;
- Discussion sur l'interprétation générale des données sur la base des résultats, dont une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une neurotoxicité pour le développement, et précisant la CSENO.

Paramètres de la cohorte 3 :

- Concentration sérique des anticorps IgM (sensibilisation avec GRM ou KLH), ou nombre de CFP dans la rate en réponse aux IgM (sensibilisation avec GRM) ;
- Confirmation de la performance de l'essai de réponse anticorps dépendante des lymphocytes T dans le cadre du processus d'optimisation par le laboratoire qui conduit l'essai pour la première fois, puis périodiquement (par exemple tous les ans) par l'ensemble des laboratoires ;
- Discussion sur l'interprétation générale des données sur la base des résultats, dont une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une immunotoxicité pour le développement, et précisant la CSENO.

Discussion des résultats

Conclusions, y compris CSENO concernant les parents et les descendants.

Toutes les informations ne résultant pas de l'étude mais utiles pour interpréter les résultats (par exemple, similitude des effets avec ceux d'autres neurotoxiques connus), sont également fournies.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

81. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance durant toutes les phases du cycle de reproduction, si besoin est. Elle livre notamment des informations sur l'appareil reproducteur et sur divers paramètres d'évaluation des effets sur le développement, la croissance, la survie et les fonctions des descendants jusqu'au JPN 90.

82. L'interprétation des résultats de cette étude tient compte de toutes les informations disponibles sur la substance, notamment ses propriétés physico-chimiques, toxicocinétiques et toxicodynamiques, les données pertinentes disponibles sur les analogues de structure et les résultats des études de toxicité antérieures sur le même produit (par exemple toxicité aiguë, toxicité après application répétée, études mécanistiques et études visant à repérer d'éventuelles différences qualitatives et quantitatives des propriétés métaboliques *in vivo/in vitro* d'une espèce à une autre). Il convient, si possible, d'interpréter les résultats de la nécropsie macroscopique et de la pesée des organes à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées. On pourra éventuellement expliquer le ralentissement de la croissance des descendants par une influence du produit chimique testé chimique testé sur la composition du lait (29).

Cohorte 2 (neurotoxicité pour le développement)

83. Les résultats des évaluations neurocomportementales et neuropathologiques sont interprétés à la lumière de tous les effets observés, selon une démarche fondée sur le poids de la preuve et le jugement d'experts. Il convient d'inclure dans la discussion les types d'effets comportementaux ou morphologiques éventuellement observés, ainsi que les preuves d'une relation dose-effet. Cette caractérisation devra englober l'évaluation de la neurotoxicité pour le développement, provenant notamment d'études épidémiologiques sur l'homme ou de rapports d'études de cas et d'études animales expérimentales (par exemple données toxicocinétiques, informations sur la relation structure-activité, données issues d'autres études de toxicité). L'évaluation des résultats comprendra une discussion analysant la signification biologique et la signification statistique. Elle inclura, le cas échéant, la relation entre les altérations neuropathologiques et comportementales observées. Pour orienter l'interprétation des résultats relatifs à la neurotoxicité pour le développement, voir la LD 426 de l'OCDE (35) et le document (31).

Cohorte 3 (immunotoxicité pour le développement)

84. La suppression ou la stimulation de la fonction immune évaluée par l'essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T est interprétée à la lumière de l'ensemble des observations effectuées. La signification des résultats de cet essai pourrait être appuyée par d'autres effets sur divers indicateurs associés aux facteurs immunologiques (comme la cellularité de la moelle osseuse, le poids et l'histopathologie des tissus lymphoïdes, la distribution des sous-populations lymphocytaires). Les effets mis en évidence par l'essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T sont susceptibles d'être moins significatifs quand d'autres toxicités se manifestent à des concentrations d'exposition inférieures.

85. Pour l'interprétation des résultats des études de la toxicité pour la reproduction et de la neurotoxicité, il est recommandé de consulter le document d'orientation 43 de l'OCDE (26).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), "A Tiered

Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment”, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), “Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets”, *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), “Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group”, *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), “Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment”, *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), “Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey”, *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), “Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). “Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats - overview of the studies”, *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), “Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology”, *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), “The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies”, *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), “Cycles and Seasons”, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), “Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights”, *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), “Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat”, *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), “Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing”, *Methods*, 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), “Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation”, *Toxicology*, 197, 23-35.

- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), "A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), "Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), "The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat". *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), "Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), "Methods for Assessing Rat Sperm Motility", *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), "Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration", *Journal of Andrology*, 13, 409-421.
- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), "Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
- (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), "Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", *Methods in Toxicology, Part A, Academic, Orlando, Florida*. pp. 319-333.
- (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), "The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
- (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), "Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
- (26) OECD (2008), Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, [ENV/JM/MONO\(2008\)16](#), OECD, Paris.
- (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), "Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
- (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), "A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today", *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
- (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), "Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams

Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components”, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), “Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats”, *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), “Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints”, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.

(32) OECD (1996), Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement, Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques, No. 422, OECD, Paris.

(33) OECD (1997), Étude de neurotoxicité, Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques, No.424, OECD, Paris.

(34) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, Series on Testing and Assessment, No. 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](#), OECD, Paris.

(35) OECD (2007), Étude de neurotoxicité pour le développement, Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques, No. 426, OECD, Paris.

(36) OECD (2007), Bio-essai utéro-trophique chez les rongeurs : Essai de dépistage à court terme des propriétés oestrogéniques, Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques, No. 440, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), Bio-essai de Hershberger sur le rat : Essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques, Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques, No. 441, OECD, Paris.

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, [ENV/JM/MONO\(2009\)11](#), OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, OECD, Paris.

(40) OECD (2011), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris (not yet available).

Appendice A

**Mesures et observations incluses dans
la batterie d'observations fonctionnelles (cohorte 2)**

Cage d'hébergement & plan ouvert

Posture
Mouvements spasmodiques et
contractures involontaires
Fermeture palpébrale
Piloérection
Salivation
Larmolement
Vocalisations
Cabrage
Démarche anormale
Éveil
Stéréotypie
Comportement bizarre
Taches
Respiration anormale

Manipulation

Facilité à saisir
Facilité à manipuler
Tonicité musculaire
Réponse à l'approche
Réponse au toucher
Réponse auditive
Réponse au pincement de la
queue
Réflexe de redressement
Étalement du pied posé sur le sol
Force de préhension des pattes
antérieures
Force de préhension des pattes
postérieures

Physiologie

Température
Poids corporel
Réflexe pupillaire
Taille de la pupille