

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

Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La Ligne directrice 422, Ligne directrice de dépistage, a été initialement adoptée en 1996, sur la base d'un protocole pour une « étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement », discuté lors de deux réunions d'experts, à Londres en 1990 (1) et à Tokyo en 1992 (2).

2. La partie relative au dépistage de la toxicité pour la reproduction et/ou le développement est fondée sur l'expérience acquise dans les pays Membres en appliquant la méthode initiale à des produits chimiques existants produits en grande quantité et en menant des essais d'orientation avec des témoins positifs (3) (4). Quant à la partie relative à la toxicité à doses répétées, elle est conforme à la Ligne directrice 407.

3. La présente Ligne directrice a été mise à jour en y introduisant des paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens, suite à une activité prioritaire lancée par l'OCDE en 1998, destinée à réviser les Lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (5). Dans ce contexte, la Ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs), a été mise à jour en 2008 en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des produits chimiques d'essai. L'objectif de la mise à jour de la Ligne directrice 422 était d'inclure des paramètres pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens dans des Lignes directrices de dépistage au cours desquelles les périodes d'exposition couvrent certaines périodes sensibles du développement (périodes prénatale ou suivant la naissance).

4. Les paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens qui ont été sélectionnés et ajoutés, font aussi partie de la Ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération) ; ils ont été introduits dans la Ligne directrice 422 sur la base d'une étude de faisabilité étudiant les questions scientifiques et techniques liées à l'inclusion de ces paramètres, ainsi que les ajustements possibles à mettre en œuvre dans la conception de l'essai pour permettre leur inclusion (6).

5. La présente ligne directrice vise l'obtention d'informations sommaires concernant les effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de

l'embryon et la parturition. Elle ne vient pas en remplacement des Lignes directrices existantes 414, 415, 416 ou 443.

CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

6. Lors de l'évaluation et de l'estimation des propriétés toxiques d'un produit chimique d'essai, on peut déterminer la toxicité orale à doses répétées après avoir obtenu une indication sur la toxicité au moyen d'essais de toxicité aiguë. On trouvera dans la présente étude des informations relatives aux dangers possibles pour la santé, découlant d'expositions répétées pendant une période relativement limitée. La méthode comprend l'étude de base de toxicité à doses répétées applicable aux produits chimiques pour lesquels une étude à 90 jours ne se justifie pas (par exemple lorsque le volume de la production ne dépasse pas une certaine limite) ou lorsqu'elle constitue une étude préliminaire à une étude à long terme. 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 (7).

7. L'étude comprend en outre un test de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement et elle peut donc être utilisée pour obtenir des informations initiales sur les effets possibles affectant les capacités reproductrices du mâle et de la femelle telles que la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition, soit à un stade précoce de l'évaluation des propriétés toxicologiques des substances chimiques, soit sur des substances chimiques préoccupantes. Cet essai ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, il n'offre que des moyens limités pour déceler des manifestations postnatales d'une exposition prénatale ou des effets imputables à une exposition postnatale. En raison (entre autres) du choix des effets observés retenus et de la brièveté de l'étude, cette méthode ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets toxiques pour la reproduction et le développement. De plus, en l'absence de données tirées d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité de procéder à d'autres essais et de définir le calendrier de ceux-ci.

8. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien » (8). La Ligne directrice 422 mise à jour fait partie du niveau 4 de ce Cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets adverses affectant les paramètres endocriniens pertinents. Un signal endocrinien ne sera néanmoins pas toujours considéré comme une preuve suffisante en tant que telle que le produit chimique d'essai est un perturbateur endocrinien.

9. Cette Ligne directrice met également l'accent sur la recherche d'éventuels effets neurologiques et elle insiste sur la nécessité de soumettre les animaux à des observations cliniques minutieuses afin de recueillir le maximum d'observations. La méthode devrait permettre de déceler des produits chimiques présentant des risques de neurotoxicité et pour lesquels des études plus approfondies dans cette voie seraient justifiées. En outre, la méthode peut aussi donner des indications relatives à l'immunotoxicité.

10. En l'absence de données résultant d'autres études de toxicité systémique, de toxicité pour la reproduction et le développement, de neurotoxicité et/ou d'immunotoxicité, des résultats positifs permettent de faire une évaluation préliminaire des dangers et d'orienter les décisions quant à la nécessité d'effectuer et de programmer des essais supplémentaires. Ce test peut être particulièrement utile dans le dossier d'Examen Détaillé des Données (EDD) des substances existantes, celles pour lesquelles on dispose de peu ou pas de données toxicologiques, où il peut être utilisé comme une alternative à la conduite de deux tests

séparés pour la toxicité à dose répétée (Ligne directrice 407) et la toxicité pour la reproduction et le développement (Ligne directrice 421), respectivement. Il peut être aussi utilisé pour sélectionner la gamme des doses en vue d'études sur la reproduction et le développement plus extensives, ou dans les cas où cela est jugé pertinent.

11. Il est généralement admis qu'il existe des différences de sensibilité entre les femelles gravides et celles qui ne le sont pas. En conséquence, il peut s'avérer plus difficile de déterminer les niveaux de dose appropriés qui permettent l'évaluation de la toxicité systémique générale et de la toxicité particulière pour la reproduction et le développement dans cet essai combiné que lorsque des essais distincts sont menés séparément. De plus, du fait de la complexité technique de l'essai, la réalisation de cet essai de dépistage combiné peut dépasser les compétences de laboratoires inexpérimentés. Cependant, outre le plus petit nombre d'animaux implique l'essai combiné peut être un meilleur moyen de distinguer les effets directs sur la reproduction et le développement de ceux, secondaires à d'autres effets (systémiques).

12. Dans le présent essai, la période d'administration des doses est plus longue que dans l'étude classique de toxicité à doses répétées sur 28 jours. En revanche, elle utilise moins d'animaux de chaque sexe par groupe par rapport au nombre d'animaux utilisés dans l'exécution d'une étude classique à doses répétées sur 28 jours qui serait faite à la suite d'un essai de dépistage de toxicité pour la reproduction et le développement.

13. La présente Ligne directrice postule que le produit chimique d'essai est administré par voie orale. Des modifications peuvent être nécessaires si d'autres voies d'exposition sont utilisées.

14. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

15. On trouvera en Annexe 1 les définitions des termes utilisés.

PRINCIPE DE L'ESSAI

16. Le produit chimique d'essai est administré en doses successives à plusieurs groupes de mâles et de femelles. L'administration aux mâles devrait s'étendre sur une période d'au moins quatre semaines jusque, et y compris, le jour précédant le sacrifice programmé de l'animal (cette période de quatre semaines couvre une période minimale de deux semaines avant et au cours de la période d'accouplement et une période approximative de deux semaines après l'accouplement). En ce qui concerne les mâles, étant donné la brièveté de l'administration avant l'accouplement, la fécondité pourrait ne pas être un indicateur particulièrement sensible de la toxicité testiculaire. En conséquence, il est indispensable de procéder à un examen histologique détaillé des testicules. On considère que la combinaison de l'administration des doses pendant deux semaines avant l'accouplement et des observations subséquentes sur l'accouplement et la fécondité (portant à quatre semaines minimum la période totale d'administration des doses), complétée par l'analyse histopathologique approfondie des gonades mâles, permet la détection de la plupart des effets sur la fécondité masculine et sur la spermatogenèse.

17. Les doses doivent être administrées aux femelles pendant toute la durée de l'étude, c'est-à-dire deux semaines avant l'accouplement (visant à couvrir au moins deux cycles menstruels complets), plus le temps variable qui peut s'écouler jusqu'à la conception, la durée de la gestation et au moins treize jours après la parturition, jusque et y compris le jour précédant le sacrifice de l'animal.

18. La durée de l'étude, après l'acclimatation des animaux et évaluation du cycle œstral préalable au traitement, dépend du comportement des femelles mais couvre environ 63 jours, [14 jours avant l'accouplement, la période d'accouplement (qui peut atteindre 14 jours), 22 jours de gestation et 13 jours de lactation].

19. Au cours de la période d'administration des doses, les animaux sont soigneusement observés à un rythme quotidien pour déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés, et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces

20. La présente Ligne directrice est conçue pour être appliquée au rat. Si les paramètres spécifiés dans la présente Ligne directrice 422 sont examinés chez une autre espèce de rongeur, une justification détaillée sera donnée. Dans le programme international de validation pour la détection des perturbateurs endocriniens pour la Ligne directrice 407, le rat était la seule espèce utilisée. Il convient d'éviter l'utilisation de souches de faible fécondité ou dont on sait qu'elles sont souvent affectées de défauts de développement. Il faut utiliser des animaux sains et vierges, qui n'ont jamais fait l'objet d'essais antérieurs. Les animaux d'essai doivent être caractérisés par leur espèce, leur souche, leur sexe, leur poids et leur âge. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux utilisés devrait être minimale et ne pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou une étude portant sur une génération complète, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Conditions d'encagement et d'alimentation

21. Toutes les procédures se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection des animaux de laboratoire. La température dans la salle des animaux doit être maintenue à 22°C ($\pm 3^\circ$). L'humidité relative doit être maintenue à 30 pour cent au moins et ne doit pas dépasser 70 pour cent, sauf durant le nettoyage de la salle. Un éclairage artificiel doit être dispensé pour obtenir une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture.

22. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe ; on peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Dans le cas d'un encagement en groupe, le nombre d'animaux par cage ne doit pas dépasser cinq. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages prévues à cet effet. Les femelles gravides doivent être placées dans des cages individuelles et disposer de matériaux nécessaires à la confection des nids. Les femelles allaitantes doivent être hébergées séparément avec leur portée.

23. La nourriture sera analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon de nourriture sera prélevé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

24. De jeunes adultes sains doivent être choisis au hasard pour être affectés aux groupes traités et aux cages. Les animaux sont marqués afin de permettre leur identification et sont placés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude afin de les acclimater aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

25. Il est recommandé d'administrer le produit chimique d'essai par voie orale, à moins que d'autres voies soient considérées comme plus appropriées. Lorsque la voie orale est choisie, le produit chimique d'essai est généralement administré par gavage ; toutefois, dans certains cas, les produits chimiques d'essai peuvent aussi être administrés dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson.

26. Le cas échéant, le produit chimique d'essai est dissout ou mis en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de recourir en priorité à une solution ou à une suspension aqueuse, en second lieu à une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple), ou à défaut dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules, s'ils sont non aqueux, doivent être connues. La stabilité et le caractère homogène du produit chimique d'essai dans le véhicule doit être déterminée.

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

27. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 mâles et 12-13 femelles. Avant le début de l'exposition, on évaluera les cycles œstraux chez les femelles et les animaux que ne présentent pas un cycle classique de 4-5 jours ne seront pas inclus dans l'étude ; c'est pourquoi on recommande l'utilisation de femelles supplémentaires, pour parvenir à 10 femelles par groupe. Sauf dans le cas d'effets toxiques marqués, on devrait obtenir au moins 8 femelles gravides par groupe, soit le nombre minimum généralement acceptable. Il s'agit d'aboutir à un nombre suffisant de gestations et à une progéniture suffisamment abondante pour permettre une évaluation fiable de l'action du produit chimique d'essai sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et l'allaitement, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1 à partir de la conception jusqu'au 13^{ème} jour après la parturition. S'il est prévu de sacrifier des animaux au cours de cette période, le nombre d'animaux d'essai doit être augmenté du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier avant le terme de l'étude. Il convient d'envisager l'adjonction d'un groupe satellite supplémentaire de cinq animaux par sexe dans le groupe témoin et dans le groupe soumis à la dose maximale afin d'observer la réversibilité, la persistance ou l'apparition d'effets toxiques systémiques différés, pendant au moins 14 jours après la fin du traitement. Les animaux du groupe satellite ne seront pas accouplés et ne pourront donc pas être utilisés pour évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement.

Détermination des doses

28. En général, il faudra utiliser au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin. Si on ne dispose pas de données appropriées relatives à la toxicité générale, il y aura lieu d'effectuer une étude d'orientation (avec des animaux de même souche et même source) afin de déterminer les doses à utiliser. Exception faite de l'administration du produit chimique d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes soumis à l'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, le groupe témoin doit en recevoir le volume administré le plus élevé.

29. La détermination des niveaux des doses doit prendre en compte toutes les données sur la toxicité et les caractéristiques (toxico-)cinétiques disponibles. Il faut aussi prendre en compte le fait que les femelles gestantes et non-gestantes peuvent présenter des sensibilités différentes. La dose la plus élevée doit être choisie de façon à provoquer des effets toxiques mais sans provoquer la mort ou des souffrances manifestes. Ensuite, il convient de déterminer les doses par ordre décroissant pour mettre en évidence toute relation entre traitement et réponse et, au niveau de la dose la plus faible, l'absence d'effets nocifs. On considère généralement optimal de définir des intervalles d'un facteur deux à quatre, l'intégration d'un

quatrième groupe étant souvent jugé préférable à l'utilisation d'intervalles trop importants (supérieurs à un facteur de 10) entre les niveaux des doses.

30. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres endocriniens devront être interprétés avec précaution.

Épreuve limite

31. Si l'administration orale d'une dose au moins égale à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, en cas d'administration par le biais de l'alimentation, à un pourcentage équivalent dans la nourriture ou dans l'eau (en fonction du poids corporel), selon les modalités précisées pour cette étude, ne provoque aucun effet toxique observable et si aucune toxicité n'est à prévoir compte tenu des données relatives à des substances présentant une structure voisine, on peut juger qu'il n'est pas nécessaire d'entreprendre une étude complète faisant intervenir plusieurs niveaux de doses. Toutefois, l'exposition humaine prévisible peut conduire à retenir un niveau de dose plus élevé pour l'essai limite. Pour d'autres types d'administration, tels que l'inhalation et l'absorption par voie cutanée, les propriétés physico-chimiques des substances d'essai peuvent souvent dicter l'exposition maximale qui peut être mise en œuvre.

Administration des doses

32. Le produit chimique d'essai est administré aux animaux chaque jour de la semaine. En cas de gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation adaptée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal soumis à l'essai. Il ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf s'il s'agit d'une solution aqueuse pour laquelle le volume peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite de produits chimiques d'essai irritants ou corrosifs qui feront normalement apparaître des effets d'autant plus marqués que les concentrations seront élevées, la variabilité du volume d'essai devrait être réduite au minimum grâce à un ajustement de la concentration de sorte que le volume soit constant quel que soit le niveau de la dose.

33. En cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, il importe de veiller à ce que les quantités de produit chimique d'essai utilisées ne perturbent pas l'équilibre normal de la nutrition ou de l'hydratation. Lorsque le produit chimique d'essai est administré par la nourriture, on peut retenir soit une concentration constante dans les aliments (ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids du corps de l'animal ; l'option retenue doit être précisée. En cas d'administration par gavage, la dose doit être apportée quotidiennement à heures fixes et ajustée au moins une fois par semaine pour être maintenue à un niveau constant par rapport au poids du corps de l'animal. Lorsque l'étude combinée est une étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou à une étude approfondie de la toxicité pour la reproduction, il faut prendre soin d'assurer une alimentation identique dans les deux études.

Calendrier de l'étude

34. L'administration de la substance aux animaux des deux sexes doit commencer deux semaines avant l'accouplement, après une période d'acclimatation d'au moins cinq jours et après avoir observé que les femelles présentaient un cycle œstral normal (au cours d'une période prétraitement de 2 semaines). L'étude doit être programmée de telle sorte que l'accouplement débute peu après que les animaux ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Celle-ci intervient à des âges qui varient légèrement selon les espèces et selon les laboratoires, à savoir 10 semaines pour les rats Sprague Dawley et 12 semaines environ pour les rats Wistar. Les femelles ayant mis bas doivent être sacrifiées le 13^{ème} jour qui suit la parturition ou

peu après. Afin d'astreindre les femelles à un jeûne de douze heures avant le prélèvement de sang (si telle est l'option choisie), il n'est pas nécessaire de sacrifier les femelles et leur progéniture le même jour. Le jour de la naissance (où la parturition est achevée) marque le jour 0 de la période post partum. Les femelles qui ne montrent aucun signe de copulation sont sacrifiées 24 à 26 jours après le dernier jour de la période d'accouplement. L'administration de la substance d'essai aux mâles et aux femelles se poursuit durant la période d'accouplement. Au-delà, elle doit continuer pour les mâles, au moins jusqu'à la fin de la période totale d'administration, soit un minimum de 28 jours. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou bien maintenus en vie et continuent alors à recevoir la substance d'essai en vue, le cas échéant, d'un second accouplement.

35. L'administration quotidienne du produit chimique d'essai aux femelles de la génération parentale doit continuer pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3^{ème} jour post partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. En ce qui concerne les études dans lesquelles le produit chimique d'essai est administrée par inhalation ou par voie cutanée, l'administration doit se poursuivre au moins jusqu'au 19^{ème} jour inclus de la gestation, et l'administration doit être initiée à nouveau dès que possible et pas après le 4^{ème} jour suivant la naissance.

36. Les animaux appartenant au groupe satellite, réservés aux observations de suivi, si elles sont prévues, ne sont pas soumis à l'accouplement. Ils devraient être maintenus en vie sans être traités pendant 14 jours au moins après le premier sacrifice de femelles prévu, afin de déceler l'apparition différée, la persistance ou la disparition complète des effets toxiques.

37. On trouvera une représentation schématique du calendrier d'essai en Annexe 2.

Cycle œstral

38. Les cycles œstraux sont contrôlés avant le début du traitement pour sélectionner pour l'étude des femelles présentant un cycle régulier (voir paragraphe 27). Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour depuis le début du traitement jusqu'à la confirmation de l'accouplement. Si l'on suspecte que des effets liés à un stress aigu lors de l'initiation du traitement pourraient perturber le cycle œstral, les laboratoires peuvent exposer les animaux de l'essai pendant deux semaines, puis effectuer des frottis vaginaux chaque jour pour contrôler le cycle œstral pendant un minimum de deux semaines débutant au début de la période de pré-accouplement et se poursuivant durant la période d'accouplement, jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (8) (9).

Modalités d'accouplement

39. On utilise normalement des couples 1:1 (un mâle pour une femelle). Il peut y avoir exception à cette règle si des mâles viennent à mourir. La femelle doit être placée avec le même mâle jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Chaque matin, il convient d'examiner les femelles pour vérifier la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (présence de sperme ou d'un bouchon vaginal). Lorsque le couple s'avère improductif, on peut envisager de ré-accoupler les femelles avec des mâles éprouvés du même groupe.

Taille des portées

40. 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 quatre ou cinq petits par sexe par portée, en fonction de la taille normale d'une portée dans la souche de rats utilisée. Des échantillons de sang seront prélevés sur deux des animaux surnuméraires, mis en commun, et utilisés pour la détermination des niveaux sériques de T4. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des

petits, par exemple basée sur le poids corporel ou la distance ano-génitale (DAG). Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre ou cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles). Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée. S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

41. Si la taille des portées n'est pas ajustée, deux petits par portée seront sacrifiés au 4^e jour après la naissance et des échantillons de sang seront prélevés pour la mesure des concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes. Si possible, les deux petits par portée seront des femelles afin de réserver les mâles pour l'examen de la persistance du mamelon, exception faite du cas où l'élimination de ces petits ne laisse aucune femelle pour les évaluations terminales. Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée (en fonction de la taille normale d'une portée chez la souche de rats employée). S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

Observations

42. Tous les jours, les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général, de préférence aux même(s) moments de la journée et en considérant la période du pic des effets attendus après administration des doses. L'état de santé des animaux doit être noté. Des observations de morbidité et de mortalité sont effectuées sur tous les animaux au moins deux fois par jour.

43. Chaque animal de la génération parentale doit faire l'objet d'un examen clinique détaillé avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur le même sujet) et au moins une semaine après. Ces examens doivent être effectués hors de la cage d'hébergement sur une aire standard. Ces observations doivent être soigneusement notées, de préférence au moyen de systèmes de notations explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimaliser les variations des conditions de l'essai et les examens doivent être conduits de préférence par des observateurs tenus dans l'ignorance du traitement. Les observations notées devraient porter, sans que cette liste soit exhaustive, sur les modifications de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes 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 de la démarche, de la posture, de la réaction à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypes (par exemple toilettage excessif, circuits répétitifs), parturition difficile ou prolongée ou comportements bizarres (par exemple automutilation, marche à reculons) (11).

44. A un certain moment au cours de l'étude, il convient également d'étudier la réactivité sensorielle à des stimuli de divers types (par exemple stimuli auditif, visuel et proprioceptif) (8) (9) (11), la force de préemption (12) et l'activité motrice (13). Ces études doivent être menées sur cinq mâles et cinq femelles choisis au hasard dans chaque groupe. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées plus de détails sur les modes opératoires. Toutefois, il est possible de recourir à d'autres modes opératoires. Chez les mâles, ces observations fonctionnelles devraient être effectuées vers la fin de la période d'administration de la substance d'essai, peu de temps avant la date prévue pour leur sacrifice mais avant l'échantillonnage du sang pour les analyses hématologiques ou de chimie clinique (voir paragraphes 53-56 ainsi que la note de bas de page relative à ces paragraphes). Les femelles devraient se trouver dans le même état physiologique au cours de ces tests fonctionnels qui devraient être menés, de préférence une fois au cours de la dernière semaine de lactation (par exemple, 6^e-13^e jour de lactation), peu de temps avant

la date fixée pour leur sacrifice. Dans la mesure du possible, il faudra minimiser les temps de séparation des mères et des petits.

45. On peut omettre ces observations fonctionnelles à effectuer une fois vers la fin de l'étude lorsque cette dernière est une étude d'orientation préliminaire à une étude ultérieure subchronique (90 jours) ou à long terme. Dans ce cas, les observations fonctionnelles devraient être effectuées au cours de l'étude à plus long terme. Dans d'autres cas, les données disponibles sur les observations fonctionnelles dans cette étude à dose répétée peuvent augmenter la capacité de choisir les doses pour une étude consécutive subchronique ou à long terme.

46. À titre exceptionnel, on peut également omettre les observations fonctionnelles pour des groupes qui manifestent des effets toxiques à un niveau qui risquerait d'interférer significativement avec les résultats des essais fonctionnels.

47. Il convient de noter la durée de la gestation, calculée à partir du jour 0 défini ci-dessus. Chaque portée devrait être examinée aussitôt que possible après sa mise-bas afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, des mort-nés, des vivants, des avortons (petits d'une taille nettement inférieure à celle des individus témoins) ainsi que la présence de grosses anomalies.

48. Il convient de dénombrer et de déterminer le sexe des petits vivants et de peser les portées dans les 24 heures suivant la parturition (jour 0 ou 1 post partum), et au moins les 4ème et 13ème jours post partum. Outre les observations portant sur les animaux parents (voir paragraphes 43 et 44) il faut noter tout comportement anormal des rejetons.

49. On mesure la DAG de chaque petit au même jour suivant la naissance, entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG ; la DAG est rapportée à une mesure de la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (14). On devra compter le nombre de mamelons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13, comme le document d'orientation 151 de l'OCDE le recommande (15).

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

50. Les mâles et les femelles doivent être pesés le premier jour d'administration de la substance d'essai, puis au moins une fois par semaine, ainsi que le dernier jour. Au cours de la gestation, les femelles doivent être pesées les jours 0, 7, 14 et 20, et dans les 24 heures qui suivent la parturition (jour 0 ou 1 post partum), ainsi que les 4ème et 13ème jour post partum. Ces observations sont à enregistrer de manière individuelle pour chaque animal adulte.

51. Durant les périodes de pré-accouplement, de gestation et de lactation, la consommation alimentaire doit être mesurée au moins une fois par semaine. Cette mesure est facultative pendant la période d'accouplement. La consommation d'eau doit également être mesurée durant les périodes en question lorsque le produit chimique d'essai est administré par ce moyen.

Hématologie

52. Une fois au cours de l'étude, il convient d'effectuer sur cinq mâles et cinq femelles choisis au hasard dans chaque groupe les examens hématologiques suivants: hémocrite, concentrations d'hémoglobine, comptage des érythrocytes, réticulocytes, comptage total et différentiel des leucocytes, comptage des plaquettes et mesure du temps et du potentiel de coagulation du sang. D'autres analyses telles que la concentration en méthémoglobine et les corps de Heinz seront réalisées si la substance d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont suspectés d'avoir des propriétés oxydantes.

53. Les échantillons de sang doivent être prélevés sur un site bien déterminé. Les femelles doivent se trouver dans le même état physiologique au cours de l'échantillonnage. Afin d'éviter des difficultés pratiques liées à la variabilité du début de la gestation, les prélèvements de sang chez les femelles doivent être effectués à la fin de la période de pré-accouplement au lieu d'être prélevé juste avant ou au cours du sacrifice des animaux. Les échantillons de sang des mâles devraient de préférence être prélevés juste avant, ou pendant le sacrifice des animaux. On peut aussi prélever le sang des mâles à la fin de la période de pré-accouplement au cas où cette option aurait été choisie pour les femelles.

54. Les échantillons de sang doivent être conservés dans des conditions adéquates.

Biochimie clinique

55. Les études de biochimie clinique ont pour objet d'étudier les principaux effets toxiques sur les tissus et, plus précisément, sur le rein et le foie. Elles doivent être exécutées sur des échantillons de sang prélevés sur les cinq mâles et les cinq femelles choisis dans chaque groupe. Il est recommandé d'effectuer les prélèvements de sang sur des animaux à jeun depuis la veille au soir¹. L'étude du plasma ou du sérum comporte la détermination des substances ci-après : sodium, potassium, glucose, cholestérol total, urée, créatinine, protéines totales et albumine, au moins deux enzymes indicatrices d'effets sur les cellules hépatiques (telles que l'alanine-aminotransférase, l'aspartate-aminotransférase et la sorbitol-déshydrogénase) ainsi que les acides biliaires. Dans certaines circonstances, la mesure d'autres enzymes (hépatiques ou autres) et de la bilirubine peut fournir des informations utiles.

56. Des échantillons sanguins sont prélevés sur un site défini selon le schéma suivant :

- chez au moins deux petits par portée au jour 4 après la naissance, si le nombre de petits le permet (voir paragraphes 40-41);
- chez toutes les mères et chez au moins deux petits par portée à la fin de l'expérience au jour 13, et
- chez les adultes mâles à la fin de l'expérience.

Tous ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées. Les échantillons de sang des petits à JPN13 et des adultes mâles font l'objet d'un dosage sérique d'hormones thyroïdiennes (T4). D'autres évaluations de T4 dans les échantillons de sang des mères et des petits à JPN 4 peuvent être réalisées, le cas échéant. De manière optionnelle on pourra mesurer d'autres hormones, le cas échéant. Le sang des petits peut être mis en commun par portée pour l'analyse des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes (T4 et TSH) seront de préférence mesurées sous forme 'totale'.

57. À titre facultatif, on peut effectuer les observations ci-après sur les urines de cinq mâles choisis au hasard dans chaque groupe, recueillies pendant un intervalle de temps déterminé au cours de la dernière semaine de l'étude: apparence, volume, osmolalité ou masse volumique, pH, protéines, glucose, sang/cellules sanguines

¹ Pour un certain nombre de mesures sur le sérum ou le plasma, notamment pour la mesure du glucose, il est préférable de prélever le sang sur l'animal à jeun depuis la veille. La principale raison de cette préférence tient au fait que si l'animal n'est pas à jeun les résultats seront inévitablement plus variables, ce qui tendra à masquer les effets les moins évidents et rendra l'interprétation des résultats plus difficile. D'autre part, le maintien à jeun de l'animal peut interférer avec le métabolisme général des animaux (gravides), perturber les comportements de lactation et d'allaitement et pourrait perturber, surtout dans les études de nutrition, l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on adopte la pratique du prélèvement à jeun depuis la veille au soir, les analyses de biochimie clinique devraient être exécutées après les observations fonctionnelles à effectuer pendant la 4ème semaine de l'étude.

58. En outre, on peut envisager de rechercher dans le sérum des indicateurs de dommages aux tissus. D'autres analyses pourraient être effectuées si les propriétés connues du produit chimique d'essai sont susceptibles, ou peuvent être soupçonnées, de perturber des activités métaboliques et leurs indicateurs tels que le calcium, les phosphates, les triglycérides à jeun, le glucose à jeun, certaines hormones, la méthémoglobine et la cholinestérase. Le dosage de ces substances se fera au cas par cas.

59. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues des déterminations hormonales :

- le moment du sacrifice, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales,
- la méthode de sacrifice, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes
- les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.

60. Les échantillons de plasma spécifiquement destinés à la détermination des hormones doivent être obtenus à des moments de la journée comparables. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent en fonction du kit commercial utilisé.

61. Si l'on ne dispose pas d'une base données historiques adéquate, il faut envisager de déterminer les paramètres hématologiques et biochimiques avant d'administrer la substance d'essai, ou de façon préférable, réaliser ces déterminations dans un groupe d'animaux qui ne soit pas inclus dans le groupe d'animaux de l'expérience. Pour les femelles, les données doivent provenir des femelles allaitantes.

PATHOLOGY

Autopsie générale

62. Tous les animaux adultes étudiés doivent faire l'objet d'une autopsie générale complète et détaillée qui comporte un examen minutieux de la surface externe du corps, de tous les orifices et des cavités crânienne, thoracique et abdominale ainsi que du contenu de ces cavités. On s'intéressera plus particulièrement aux organes de l'appareil reproducteur. Le nombre de sites d'implantation d'embryons doit être consigné. Les frottis vaginaux sont examinés le matin du jour de la nécropsie pour déterminer quelle est la phase du cycle œstral et permettre une corrélation avec l'histopathologie des organes reproducteurs femelles.

63. Les testicules et épидидymes de même que la prostate et les vésicules séminales avec les glandes de coagulation entières de tous les animaux mâles adultes devront être débarrassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et leur poids mesuré aussitôt après la dissection pour éviter toute déshydratation. En outre, les mesures optionnelles de poids d'organes peuvent inclure le complexe des muscles élévateur de l'an us et bulbo-caverneux, les glandes de Cowper et le gland du pénis chez les mâles, et les ovaires et l'utérus (y compris le col) chez les femelles. Dans le cas où ces mesures optionnelles sont consignés, elles doivent être effectuées aussitôt que possible après la dissection afin d'éviter toute déshydratation. Les ovaires, les testicules, les épидидymes, les organes sexuels accessoires, et tous les organes des animaux adultes présentant des lésions macroscopiques seront conservés.

64. La glande thyroïde de tous les adultes mâles et femelles ainsi que d'un male et d'une femelle de 13 jours de chaque portée doit être préservée dans le milieu de fixation le plus approprié en vue des examens histopathologiques prévus ultérieurement. Le poids de la thyroïde peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie. Des

échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées (voir paragraphe 56).

65. En outre, on choisira au hasard au moins cinq mâles et cinq femelles adultes dans chaque groupe (à l'exception de ceux identifiés comme moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'étude) dont on prélèvera le foie, les reins, les glandes surrénales, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur, débarassées de tout tissu adhérent si nécessaire, et seront pesés aussitôt après dissection afin d'éviter toute déshydratation. Les tissus ci-après seront prélevés pour les conserver dans le milieu de fixation le plus approprié, en fonction du type de tissu et des examens histopathologiques que l'on entend effectuer : toutes les lésions importantes, le cerveau (les régions représentatives comportant l'encéphale, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, l'œil, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la trachée et les poumons (qui seront conservés par injection d'un fixateur suivie d'une immersion), les gonades (testicules et ovaires), les organes sexuels accessoires (utérus et col de l'utérus, épидидymes, prostate, vésicule séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques (le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire(16)), un nerf périphérique (le sciatique ou le tibial) de préférence tout près du muscle, un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (7) (18); la fixation au formol est déconseillée pour ces tissus. La tunique albuginée peut être perforée en douceur et de façon superficielle aux deux pôles de l'organe avec une aiguille permettant une pénétration rapide du liquide de fixation. Les résultats des observations cliniques et des autres observations pourraient inciter à l'examen d'autres tissus. On devrait également conserver tout autre organe considéré comme étant susceptible d'être un organe cible d'après les propriétés connues de la substance d'essai.

66. Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens : gonades (ovaires et testicules), organes sexuels accessoires (utérus et col de l'utérus, épидидymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action oestrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 65 est facultative.

67. Les petits morts ainsi que ceux qui sont sacrifiés au 13^{ème} jour post partum, ou peu après, doivent être au moins soumis à un examen externe rigoureux visant à déterminer d'éventuelles anomalies flagrantes. Une attention particulière devra être apportée aux organes génitaux reproducteurs externes, pour lesquels on recherchera des signes de modification de leur développement.

Histopathologie

68. On doit effectuer un examen histopathologique approfondi des organes et des tissus conservés et prélevés sur les animaux choisis dans le groupe témoin et dans le groupe exposé à de fortes doses (en mettant l'accent sur les phases de spermatogénèse dans les gonades mâles et sur l'examen histopathologique des structures cellulaires interstitielles des testicules). La glande thyroïde des petits et des animaux adultes restants pourra être examinée si nécessaire. Au cas où l'on observerait des modifications liées au traitement dans le groupe exposé à des doses élevées, il convient d'étendre ces examens à des animaux des autres groupes traités. Le document d'orientation sur l'histopathologie (10) donne plus de détails sur la dissection, la fixation, la section et l'histopathologie des tissus endocriniens.

69. Toutes les lésions importantes doivent être examinées. Afin d'aider à définir la concentration sans effet nocif observé (CSENO), il conviendra d'examiner des organes cibles dans d'autres groupes exposés, en particulier dans les groupes correspondant à des niveaux de dose égaux ou inférieurs à la CSENO.

70. En cas d'utilisation d'un groupe satellite, les examens histopathologiques doivent être effectués sur des tissus et des organes sur lesquels des effets ont été décelés dans les groupes traités.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

71. Des données individuelles sont à fournir pour chaque animal. Elles doivent en outre être présentées sous la forme d'un tableau indiquant pour chaque groupe étudié le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux morts au cours de l'essai ou euthanasiés, ainsi que le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, une description des signes de toxicité observés, comprenant le moment du déclenchement, la durée et la gravité des effets toxiques éventuels, les types de modifications histopathologiques, ainsi que toutes les informations dignes d'intérêt concernant les portées. On trouvera dans l'annexe 3 un modèle de rapport succinct sous forme de tableau qui s'avère très utile pour l'évaluation des effets sur la reproduction et le développement.

72. Chaque fois que c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée et généralement acceptée. Les comparaisons de l'effet en fonction de la dose utilisée ne devront pas utiliser de tests-t multiples. Les méthodes statistiques utilisées devraient être choisies lors de la conception de l'étude. L'analyse statistique de la DAG et de persistance du mamelon doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte les effets sur la portée. S'il y a lieu, l'unité d'analyse sera la portée. L'analyse statistique du poids corporel des petits doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte la taille de la portée. Compte tenu de la portée restreinte de l'étude, l'analyse statistique visant à vérifier le caractère significatif des résultats n'a qu'une valeur limitée pour de nombreux effets observés, notamment les effets sur la reproduction. Certaines des méthodes les plus couramment utilisées, notamment les tests paramétriques pour mesurer la tendance centrale sont inappropriées. Si une analyse statistique est réalisée, la méthode retenue doit convenir à la distribution de la variable examinée et doit être arrêtée préalablement à la mise en route de l'étude.

Évaluation des résultats

73. Les résultats de cette étude sur la toxicité doivent être évalués en fonction des effets observés, de l'autopsie et des données microscopiques. L'évaluation portera notamment sur le lien entre, d'une part, la dose du produit chimique d'essai et, d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les lésions grossières, les organes cibles désignés, l'infertilité, les anomalies cliniques, l'action sur la reproduction et les portées, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.

74. La période de traitement du mâle étant de courte durée, l'histopathologie des testicules et des épидидymes doit aller de pair avec les données sur la fertilité dans le cadre de l'évaluation des effets sur la reproduction chez le mâle. L'utilisation des données des témoins historiques pour la reproduction/développement (par exemple pour la taille des portées, DAG, persistance du mamelon, taux sériques de T4), pourrait, le cas échéant, s'avérer être une aide utile pour l'interprétation des données.

75. Pour le contrôle de la qualité, il est proposé que les données des témoins historiques soient collectées et que les coefficients de variation soient calculés dans le cas de données numériques, tout particulièrement pour les paramètres en lien avec la détection de perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins de comparaison quand les études sont évaluées.

Rapport

76. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai :

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible ;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude ;
- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Véhicule (s'il y a lieu) :

- raisons justifiant le choix du véhicule lorsqu'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux soumis à l'essai :

- espèce et souche ;
- nombre, sexe et âge des animaux ;
- origine, conditions d'encagement, type d'alimentation, etc. ;
- poids de chaque animal au début de l'essai ;
- justification de l'espèce si l'espèce choisie n'est pas le rat.

Conditions de l'essai :

- critères de choix des niveaux de doses ;
- précisions concernant la formulation du produit chimique d'essai et de la préparation de l'alimentation, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation ;
- description détaillée de l'administration du produit chimique d'essai ;
- conversion de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau (ppm) en dose effective (mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant ;
- précisions concernant la qualité des aliments et de l'eau ;
- description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, s'il y a eu élimination.

Résultats :

- modifications du poids corporel ;
- données relatives à la consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant ;
- données sur les effets toxiques provoqués en fonction du sexe et de la dose, concernant notamment la fertilité, la gestation et tout autre signe de toxicité ;
- durée de la gestation ;
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, la progéniture, la croissance post-natale, etc. ;
- nature, gravité et durée des manifestations cliniques observées (réversibles ou non) ;
- évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice ;
- analyses de sang et valeurs normales de référence ;
- analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence

- nombre de femelles adultes présentant un cycle œstral normal ou anormal et durée du cycle ;
- nombre de petits vivants à la naissance et pertes après implantation ;
- nombre de petits présentant des anomalies évidentes, évaluation macroscopique des organes génitaux externes, nombre d'avortons ;
- indication du moment de la mort survenue pendant l'étude, ou si l'animal a survécu jusqu'à la fin ;
- nombre d'embryons implantés, taille et poids des portées au moment de la consignation de ces données;
- données relatives au poids corporel des petits ;
- DAG de tous les petits (et poids corporel le jour de la mesure de la DAG) ;
- persistance du mamelon chez les petits mâles ;
- taux d'hormones thyroïdiennes chez les petits âgés de 13 jours et les mâles adultes (ainsi que chez les mères et chez les petits âgés de 4 jours si cela a été mesuré) ;
- poids corporel lors du sacrifice et poids des organes des animaux de la génération parentale ;
- résultats de l'autopsie ;
- description détaillée de l'examen histopathologique ;
- données sur l'absorption (si elles sont disponibles) ;
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Examen des résultats.

Conclusions.

Interprétation des résultats

77. L'étude permettra d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement liée à l'administration de doses répétées. Puisque l'accent est mis à la fois sur la toxicité générale et sur les effets toxiques sur la reproduction et le développement, les résultats de l'étude permettront de faire une distinction entre les effets toxiques pour la reproduction et pour le développement se produisant en l'absence de toxicité générale et les effets qui ne s'expriment qu'à des niveaux qui sont également toxiques pour les parents (voir paragraphes 7-11). Elle pourrait aider à déterminer s'il y a lieu d'approfondir les recherches et fournir des orientations pour la conception d'études ultérieures. Le document d'orientation 43 de l'OCDE devra être consulté pour aider à l'interprétation des résultats liés à la reproduction et au développement (19). Le document d'orientation 106 de l'OCDE sur l'évaluation histologique des essais endocriniens et de reproduction chez les rongeurs (16) fournit des informations sur la préparation et l'évaluation des organes (endocriniens) et des frottis vaginaux ; ces informations peuvent être utiles dans le cadre de la présente Ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD. (1990). Room Document No. 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponible sur Demande. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) OECD. (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible sur Demande. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. et Hayashi Y. (1994). "Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)". *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. et Tobe M. (1992). "Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide". *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.
- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponible sur Demande. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, (No. 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. et Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. et Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No. 60.)
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. et Phillips P.M. (1991). "Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.

- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. et Riley M.T. (1979). "A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice". *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reither L.W., Tilson H.A. et MacPhail R.C. (1991). "Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments". *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 559-609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. et Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 151.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (17) Hess RA, Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE et Heindel JJ (Eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANNEXE 1**DEFINITIONS****(voir aussi les le GD 150 (20))**

Activité antithyroïdienne : c'est la capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T₃) chez un organisme mammifère.

Activité thyroïdienne : c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T₃) chez un organisme mammifère.

Altération de la fertilité : perturbation des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle ou chez la femelle.

Androgénicité : c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antiandrogénicité : c'est la capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antioestrogénicité : c'est la capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone oestrogénique naturelle (par exemple le 17β-oestradiol) chez un organisme mammifère.

CSENO : concentration sans effet nocif observé. C'est la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe aucun effet dommageable lié au traitement.

Détermination des doses : notion générale englobant la dose, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.

Dose : quantité de produit chimique d'essai administrée, exprimée en poids (g, mg) ou en poids par unité de poids de l'animal soumis à l'essai (mg/kg, par exemple), ou encore en concentration dans l'aliment (ppm).

Oestrogénicité : c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone naturelle oestrogénique (par exemple le 17β-oestradiol) chez un organisme mammifère.

Toxicité évidente : notion générale qui renvoie aux signes incontestables de toxicité consécutifs à l'administration de la substance d'essai. Ceux-ci doivent être suffisants pour permettre d'évaluer le danger et se manifester de telle manière qu'une augmentation de la dose administrée se traduira selon toute vraisemblance par l'apparition de signes de grave toxicité conduisant probablement à la mort.

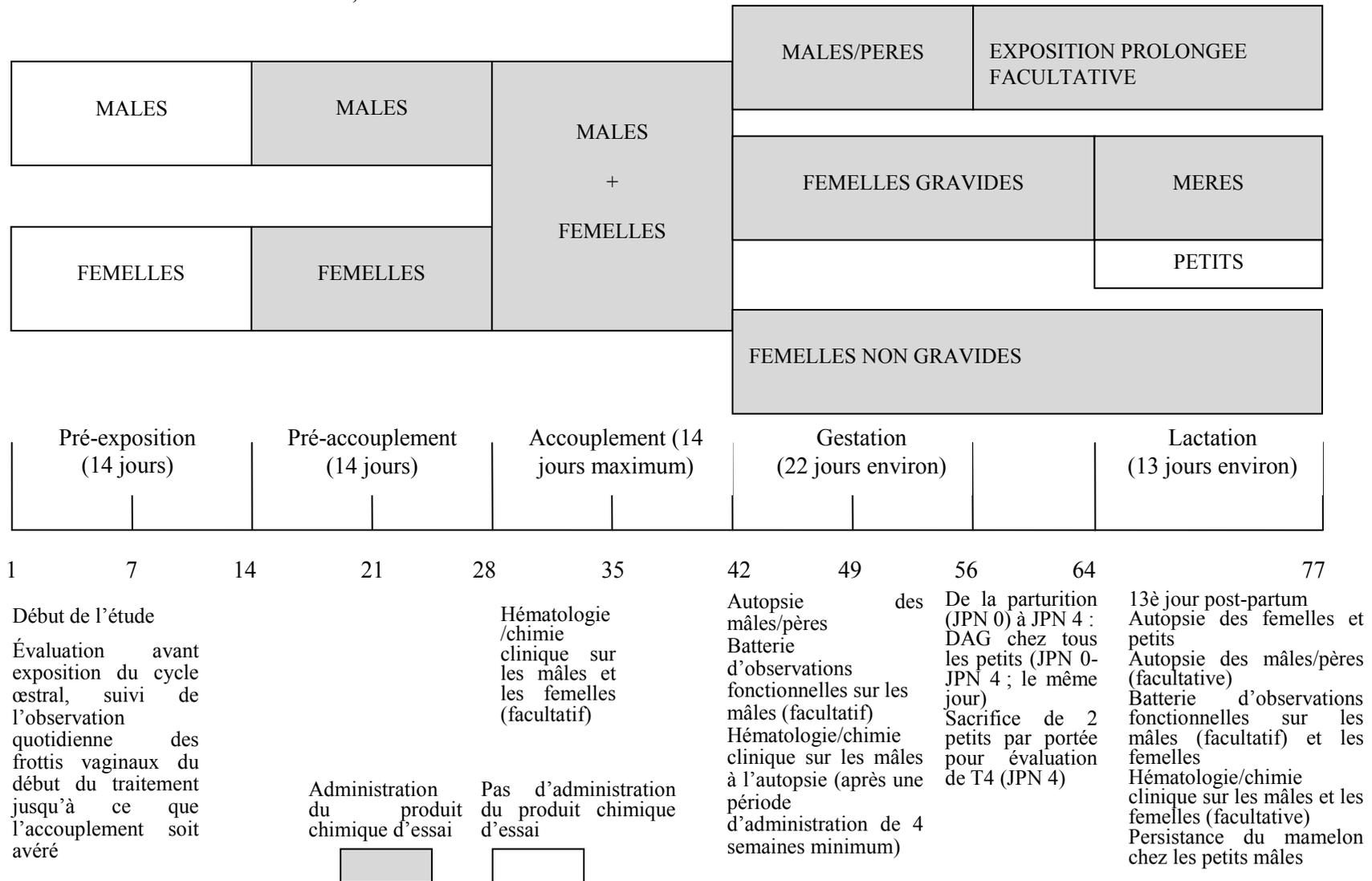
Toxicité pour le développement : prolongement de la toxicité pour la reproduction, qui se traduit pour la progéniture par des perturbations prénatales, périnatales, post-natales, structurelles ou fonctionnelles.

Toxicité pour la femelle gravide : effets défavorables sur la femelle gravide, spécifiques (effets directs) ou non (effets indirects), et liés à la gestation.

Toxicité pour la reproduction : effets préjudiciables sur la progéniture ou altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle et chez la femelle.

Validation : processus scientifique visant à caractériser les exigences opératoires et les limites d'une méthode de test et à en démontrer la fiabilité et la pertinence pour un objectif particulier.

ANNEXE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROGRAMME D'ESSAI INDIQUANT LA DUREE MAXIMALE DE L'ETUDE, POUR UNE PERIODE D'ACCOUPELEMENT COMPLETE DE 14 JOURS



ANNEXE 3
TABLEAU RECAPITULATIF DES EFFETS SUR LA REPRODUCTION ET LE
DEVELOPPEMENT

OBSERVATIONS	VALEURS				
Dose administrée (unités).....	0 (témoin)
Couples formés (N)					
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					
Femelles présentant signes d'accouplement (N)					
Femelles gravides (N)					
Jours conception 1-5 (N)					
Jours conception 6-... ⁽²⁾ (N)					
Gestation ≤ 21 jours (N)					
Gestation = 22 jours (N)					
Gestation ≥ 23 jours (N)					
Mères ayant mis bas petits vivants (N)					
Mères ayant petits vivants au 4ème jour post partum (N)					
Embryons implantés/mère (moyenne)					
Petits vivants/mère à la naissance (moyenne)					
Petits vivants/mère au 4ème jour post partum (moyenne)					
Rapport mâles/femelles à la naissance (moyenne)					
Rapport mâles/femelles au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des portées à la naissance (moyenne)					
Poids des portées au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits à la naissance (moyenne)					
Poids des petits au moment de la mesure de la DAG (moyenne des mâles, moyenne des femelles)					
DAG des petits mesurée le même jour post natal, entre la naissance et JPN 4 (moyenne des mâles, moyenne des femelles, noter le JPN)					
Poids des petits au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits au 13ème jour post partum (moyenne)					
Persistance du mamelon chez les petits mâles au jour 13 post partum (moyenne)					
PETITS PRESENTANT DES ANOMALIES					
Mères affectées par 0					
Mères affectées par 1					
Mères affectées par ≥ 2					
PERTES DE DESCENDANCE					
Pertes prénatales/après implantation (embryons implantés moins petits vivants à la naissance)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Pertes post-natales (Petits vivants à la naissance moins petits vivants au 13ème jour post partum)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					

⁽²⁾ dernier jour de la période d'accouplement