

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

Oiseaux, toxicité orale aiguë

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice décrit les procédures à suivre pour évaluer la toxicité orale aiguë de produits chimiques testés chez les oiseaux selon trois types d'essais : (1) essai de dose limite, (2) essai de détermination de la pente de la DL_{50} , (3) essai de détermination de la DL_{50} seule. Les essais de pente de la DL_{50} et de DL_{50} seule sont des procédures d'essai séquentielles. La méthode d'essai choisie dépend du besoin que l'on a ou non de déterminer la dose médiane (DL_{50}) définitive et la pente de la courbe dose-effet. Les procédures d'essai séquentielles visent la sélection des doses, et l'effet observé doit avoir le degré de précision requis. Ces procédures ont été conçues pour réduire au maximum le nombre d'oiseaux utilisés. Un programme informatique [SEquential DEsign Calculator (SEDEC)] peut aider à sélectionner les doses et à estimer la DL_{50} , la pente et les limites de confiance (voir paragraphe 51).

2. La mise au point de la présente Ligne directrice a été entreprise par le groupe de travail SETAC/OCDE sur les essais de toxicité aviaire suite à un atelier tenu à Pensacola, Floride (États-Unis) en 1994 (1) ; par la suite, des réunions d'experts de la SETAC et de l'OCDE ont été organisées en Europe et aux États-Unis pour développer et optimiser la procédure séquentielle. Celle-ci a fait l'objet d'une validation statistique complète (2).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Les informations nécessaires peuvent être extrêmement variables selon les méthodes d'évaluation des dangers. Pour répondre aux différents besoins, les trois essais ci-dessous sont envisageables:

- **Essai de dose limite** – Cet essai est privilégié en cas de faible toxicité attendue et de létalité improbable à la dose limite. La dose limite, qui doit être adaptée aux fins de l'évaluation, est en général de 2 000 mg/kg de poids corporel (kg-pc). Les exigences de certaines autorités réglementaires peuvent être de 200 mg/kg-pc ou la plus haute concentration environnementale pertinente, selon ce qui est le plus élevé. Cinq ou dix oiseaux et un groupe témoin sont utilisés pour l'essai de dose limite (figure 1).
- **Essai de détermination de la pente de la DL_{50}** – Cet essai est privilégié lorsque des exigences réglementaires ou d'une autre nature imposent de déterminer, outre une estimation de la DL_{50} , la

pente de la courbe dose-effet et/ou l'intervalle de confiance. Il se déroule en 3 ou 4 étapes avec 24 ou 34 oiseaux et un groupe témoin (figure 2)¹.

- **4. Essai de détermination de la DL₅₀ seule** – Cet essai est privilégié lorsque des exigences réglementaires ou d'une autre nature imposent de déterminer la dose létale médiane mais non la pente de la courbe dose-effet ni l'intervalle de confiance pour la DL₅₀ (figure 2). Il peut convenir pour estimer un centile de la distribution de la sensibilité d'une espèce et pour fournir des informations aux fins d'étiquetage des produits. Cet essai se déroule en deux étapes, avec 14 oiseaux et un groupe témoin (figure 2).

Avant l'utilisation de cette Ligne directrice pour des essais sur les mélanges à des fins réglementaires, il faudra prendre en compte et justifier que les résultats générés fourniront des résultats appropriés à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange.

5. Les essais de détermination de la pente de la DL₅₀ et de la DL₅₀ seule sont constitués d'étapes séquentielles (figure 2). Ces étapes sont définies comme les périodes, au cours d'une expérience, durant lesquelles les oiseaux se voient administrer une dose simultanément puis sont observés pendant un certain temps. Dans la suite du texte, les expressions « essai séquentiel » et « procédure séquentielle » feront donc référence à la fois à l'essai de détermination de la pente de la DL₅₀ et à l'essai de détermination de la DL₅₀ seule. On trouvera à l'annexe 1 un exposé de la logique et du fondement statistique des essais séquentiels.

6. Des simulations informatiques ont permis de démontrer que les caractéristiques de performance de l'essai de détermination de la pente de la DL₅₀ se prêtaient bien à l'évaluation des dangers et/ou des risques (2). Cette méthode permet en effet d'estimer la DL₅₀, les intervalles de confiance et la pente des courbes dose-effet.

7. A chaque étape des essais de détermination de la pente de la DL₅₀ ou de la DL₅₀ seule, un ou plusieurs oiseaux se voient administrer par voie orale une dose unique (mg/kg-pc) du produit chimique testé, les doses utilisées se rapprochant de plus en plus de l'estimation provisoire de la DL₅₀. Les oiseaux sont observés pendant 14 jours, mais la sélection des doses pour les étapes ultérieures dépend généralement de la mortalité et des signes de toxicité observés après trois jours. Cet intervalle peut être plus court en cas de mortalité ou de signes de récupération rapides, ou plus long si l'on observe ou prévoit une mortalité différée.

8. Il est possible de commencer les essais séquentiels (DL₅₀ seule ou pente de la DL₅₀) en utilisant les résultats d'un essai de dose limite ayant échoué (un décès ou plus) ou des informations externes. Pour les composés suspectés d'être très toxiques, l'essai peut commencer à l'étape 1, où quatre oiseaux se voient chacun administrer une dose différente, de telle sorte que les doses couvrent la meilleure estimation disponible de la DL₅₀ (d'après la DL₅₀ pour les rongeurs ou d'autres espèces d'oiseaux, par exemple). Les résultats de l'étape 1 permettent d'obtenir une estimation provisoire de la DL₅₀. L'estimation par maximum de vraisemblance (EMV) permet de déterminer les doses pour l'étape 2, où dix oiseaux se voient chacun administrer une dose différente. Si un essai de dose limite ayant échoué a permis d'obtenir une estimation provisoire de la DL₅₀, l'essai séquentiel peut commencer à l'étape 2. L'essai de détermination de la pente

¹ Lorsqu'une estimation de la pente est nécessaire, un essai dose-effet classique peut être mené à la place (USEPA OPPTS 850.2100). Par souci du bien-être des animaux, les méthodes expérimentales utilisant un plus grand nombre d'animaux (par exemple USEPA OPPTS 850.2100) ne sont généralement pas recommandées.

de la DL_{50} se poursuit jusqu'à l'étape 3, et éventuellement l'étape 4 (les règles d'arrêt sont exposées aux paragraphes 40-43).

8. Les définitions utilisées dans la présente Ligne directrice figurent à l'annexe 2.

Figure 1 : Déroulement de l'essai de dose limite; le diagramme n'inclut pas les oiseaux témoins

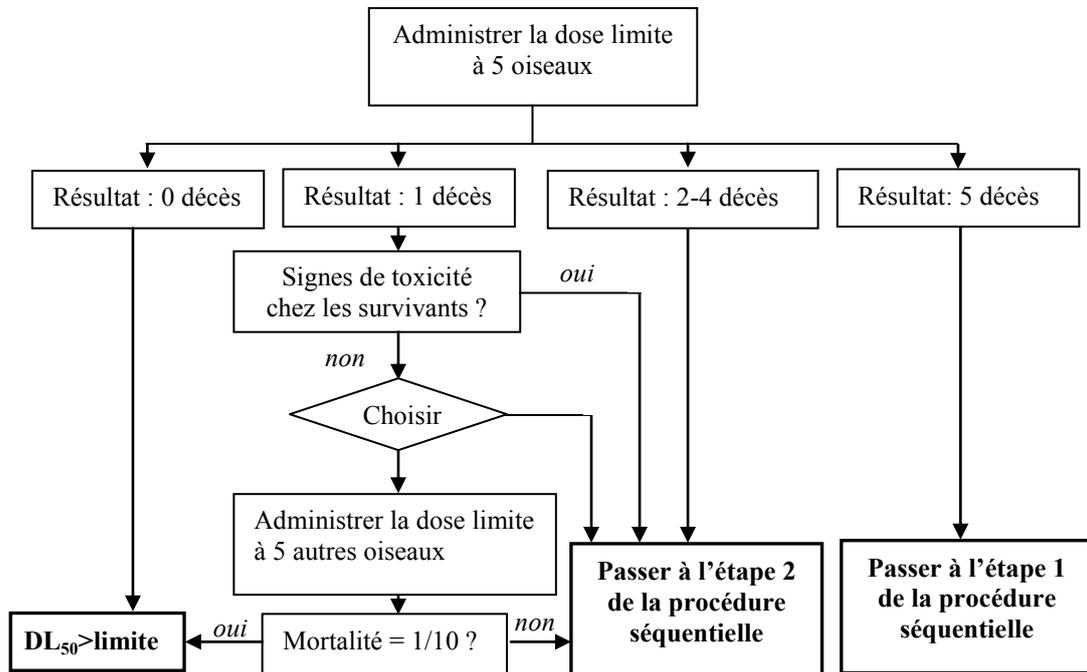
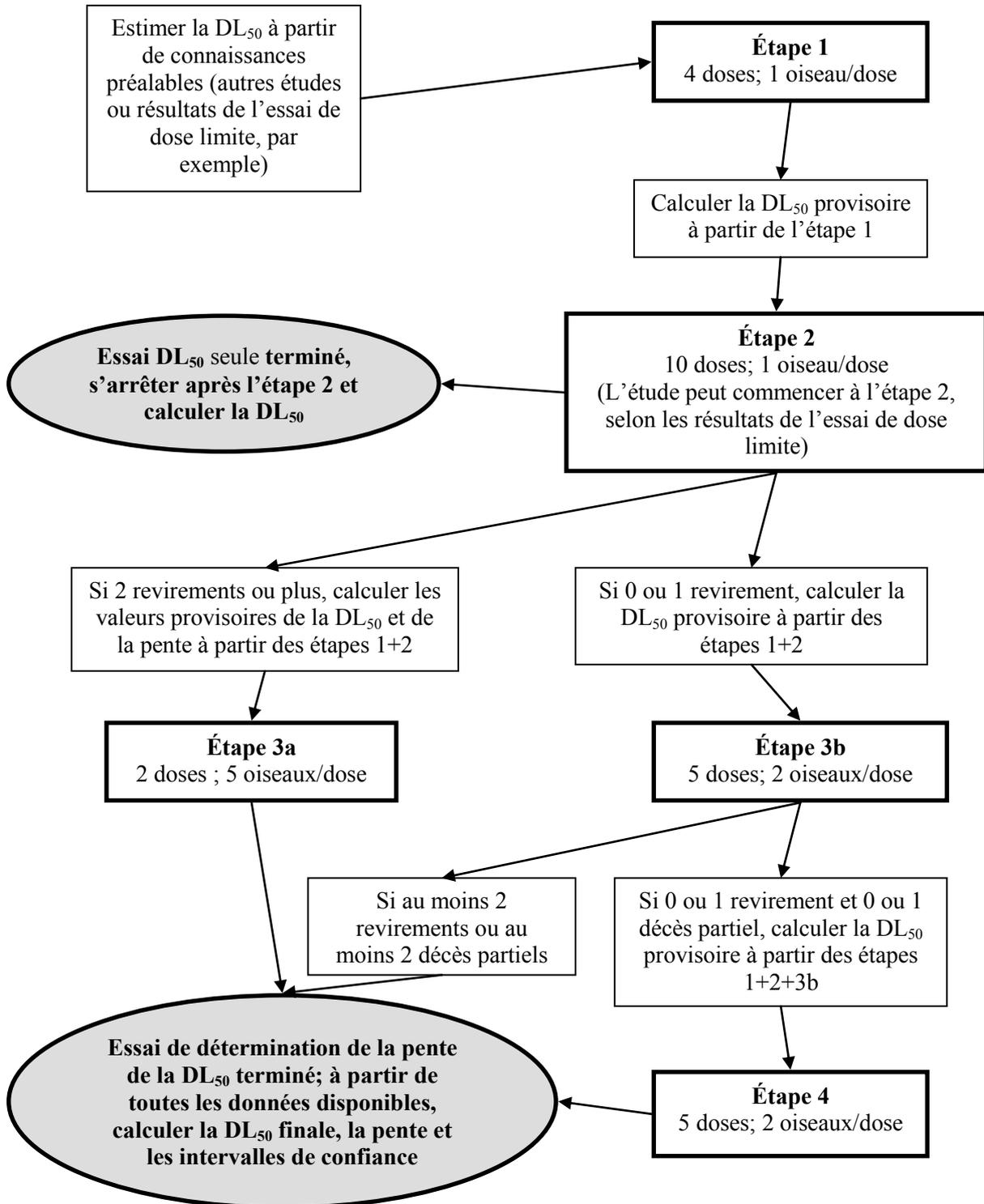


Figure 2: Déroulement de la procédure séquentielle (essais de détermination de la pente de la DL_{50} et de la DL_{50} seule) ; le diagramme n’inclut pas les oiseaux témoins. Les règles d’arrêt sont exposées plus en détail aux paragraphes 40-43.



PRINCIPE DE L'ESSAI

9. L'essai comporte un certain nombre d'étapes distinctes. A chaque étape, les oiseaux se voient simultanément administrer une dose (mg/kg-pc) de produit chimique testé dans le jabot ou le proventricule. Selon l'étape de l'essai, un même oiseau peut recevoir des doses différentes ou plusieurs oiseaux peuvent recevoir la même dose (c'est-à-dire que la dose est répliquée au cours de l'étape). La stratégie recommandée pour les essais de substances peu susceptibles de présenter un danger significatif consiste à effectuer un essai avec plusieurs oiseaux recevant la dose limite. Si l'on s'attend à une toxicité, la stratégie recommandée consiste à utiliser une procédure séquentielle plutôt que l'approche de la dose limite. Les étapes 1 et 2 nécessitent des doses non répétées, tandis que les étapes 3 et 4 nécessitent des doses répétées. A l'étape 1, la gamme de doses est déterminée en fonction de la meilleure estimation disponible de la DL_{50} (DL_{50} pour les rongeurs, par exemple). Les doses des étapes ultérieures sont déterminées en fonction des mortalités observées à toutes les étapes précédentes, afin que l'estimation de la DL_{50} et celle de la pente de la courbe dose-effet soient effectuées simultanément.

10. Après l'administration des doses, on observe les oiseaux pendant 14 jours afin de mesurer la mortalité. Il peut s'avérer nécessaire de prolonger la période d'observation en cas d'effets retardés. La méthode d'essai séquentielle est plus facile à appliquer pour les produits chimiques qui provoquent le décès en quelques jours. Dans ces cas, il n'est pas nécessaire d'attendre 14 jours pour passer à l'étape suivante, bien que l'observation de tous les oiseaux doive être poursuivie. La mortalité observée plus tôt (en général, au bout de trois jours) peut servir à déterminer les doses pour l'étape suivante. Les oiseaux présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse doivent être euthanasiés immédiatement. Les résultats obtenus à l'issue des trois premiers jours d'une étape suffisent en général pour déterminer si les oiseaux sont susceptibles de se remettre des effets subis ou si d'autres décès vont survenir (2). Le calcul de l'estimation provisoire le 3^e jour d'une étape d'essai permet de terminer l'essai et d'administrer toutes les doses dans un délai plus court. Si les résultats obtenus au bout de 3 jours indiquent que d'autres décès peuvent se produire à une étape de l'essai, le calcul de l'estimation provisoire de la DL_{50} peut être différé jusqu'à la récupération manifeste des oiseaux restants. Dans certains cas, il peut être nécessaire d'attendre jusqu'à 14 jours avant de passer à l'étape suivante. Le calcul final dépend des résultats à 7 jours obtenus à toutes les étapes.

11. La mortalité est le principal effet observé dans cette étude, la mort naturelle étant présumée négligeable. Des témoins sont nécessaires pour surveiller la santé et les conditions d'élevage des oiseaux d'essai et s'assurer que la capacité de l'étude de fournir des résultats fiables n'est pas compromise. Les procédures et calendriers applicables aux oiseaux témoins sont décrits aux paragraphes 44-45. Au cours de l'essai, les animaux présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère doivent être euthanasiés immédiatement. Autant que faire se peut, l'utilisation de critères éthiquement acceptables tels que décrits dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (*OECD Guidance Document on the Use of Humane Endpoints*) est prise en compte lors de la réalisation de cet essai (10).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. S'il survient une mortalité supérieure à 10% dans le groupe témoin, l'essai est considéré comme non valide. Aucun animal supplémentaire ne devrait être ajouté dans le groupe témoin au cours de l'essai, excepté dans les cas indiqués aux paragraphes 25 et 45.

DESCRIPTION DE LA METHODE EXPERIMENTALE

Sélection des oiseaux

13. On utilise de préférence des espèces élevées en captivité, présentant une faible mortalité naturelle et une faible propension à régurgiter. Les espèces souvent utilisées répondant à ces exigences sont le colin de Virginie, *Colinus virginianus*, et la caille du Japon, *Coturnix japonica* (Galliformes). Le recours à des oiseaux capturés dans la nature est évité autant que possible, par souci de protection des animaux et de contrôle des maladies.

14. S'il s'avère nécessaire d'utiliser d'autres espèces afin d'obtenir une distribution de la sensibilité des espèces, les espèces suivantes peuvent être considérées: le canard colvert, *Anas platyrhynchos* (Anseriformes), le pigeon biset, *Columba livia* (Columbiformes), le diamant mandarin, *Poephila guttata* (Passeriformes) et la perruche ondulée, *Melopsittacus undulatus* (Psittaciformes) peuvent être utilisés. Cette liste non exhaustive d'espèces recommandées a seulement pour objet d'indiquer des espèces de laboratoire relativement robustes appartenant à différents ordres. La mortalité de base chez l'espèce choisie doit être démontrée comme inférieure à 1% dans le laboratoire d'essai. La mortalité de 1% correspond à celle observée chez le colin, seule espèce utilisée lors des études de validation de la Ligne directrice 223.

15. Les oiseaux doivent être recouverts d'un plumage mature mais ne pas être en état de reproduction. Les phénotypes sauvages sont privilégiés, dans la mesure du possible. Les oiseaux élevés en captivité proviennent de la même source et de la même population reproductrice, et si possible l'historique génétique doit révéler des croisements périodiques visant à maintenir l'hétérogénéité génétique. S'il n'est pas possible d'utiliser des phénotypes sauvages, les oiseaux sélectionnés doivent être issus de différents phénotypes afin de limiter la consanguinité.

16. Les traitements doivent être administrés à des oiseaux choisis de façon aléatoire dans des groupes d'oiseaux des deux sexes ou de même sexe dont l'appareil reproducteur est inactif. L'utilisation d'oiseaux qui ne sont pas en état de reproduction peut aider à réduire au maximum les différences de sensibilité à l'administration orale aiguë de pesticides en fonction du sexe des oiseaux (3) (4). Pour certains produits chimiques testés ou classes de produits, une sensibilité liée au sexe des oiseaux peut déjà avoir été mise en évidence (5). La fréquence des différences de toxicité liées au sexe selon les produits chimiques est incertaine. Si une sensibilité liée au sexe est suspectée, des essais sont réalisés pour permettre l'estimation de la DL_{50} pour chaque sexe.

Conditions d'encagement et d'essai

17. La présente Ligne directrice est conçue de façon à avoir un oiseau par concentration aux premières étapes de l'étude. Pour observer les effets et enregistrer si et quand la régurgitation a lieu, il est vivement recommandé de prévoir un encagement individuel des oiseaux, au moins pendant les trois premiers jours de l'étude. Cela permet d'observer les oiseaux individuellement et de noter les détails concernant leur comportement (y compris la régurgitation). Il est essentiel, dans le cas d'espèces sociables telles que le diamant mandarin, et vivement recommandé pour les autres espèces, de placer les oiseaux dans des cages côte à côte afin de permettre des interactions sociales visuelles et auditives. Cette étude étant conçue de façon à ce que les oiseaux soient placés dans des cages individuelles, les conditions d'encagement doivent respecter les limites optimales pour les espèces d'essai, l'espace minimal recommandé étant de 3 333 cm² pour le pigeon, 2 000 cm² pour le colvert, 1 000 cm² pour la caille et le colin, et 500 cm² pour la perruche ondulée et le diamant mandarin. L'espace par oiseau est plus grand si les

directives et/ou la réglementation de la région ou du pays en matière de protection des animaux² l'exigent ou le recommandent. Le fond des cages est constitué d'une grille à mailles suffisamment larges pour permettre aux matières fécales de passer à travers sans pour autant entraver les mouvements des oiseaux. Les cages abritant les pigeons, les diamants mandarins et les perruches ondulées doivent être munies de perchoirs. De plus amples informations sur le soin aux espèces aviaires peuvent être trouvées dans les guides FELASA 2007 (11).

18. L'essai peut être mené dans des conditions contrôlées ou à température et humidité ambiantes. La température est maintenue entre 15 et 27°C pour la caille, le colin et le colvert, mais varie le moins possible au cours des étapes de l'essai. La ventilation est suffisante pour permettre au moins dix renouvellements d'air par heure. La photopériode pour la caille, le colin et le colvert est de huit heures de clarté et 16 heures d'obscurité. Pour les autres espèces, il peut s'avérer nécessaire d'allonger la phase de clarté pour la porter à dix heures. Les oiseaux doivent être nourris en aliments frais et en eau à satiété. Des aliments pour gibier à plumes et des compléments vitaminiques vendus dans le commerce peuvent être utilisés, mais ils doivent être adaptés aux espèces sur le plan nutritionnel. L'administration de médicaments est évitée pendant les 14 jours qui précèdent l'administration des doses, pendant l'administration des doses et pendant la période d'observation. Les aliments et l'eau sont analysés périodiquement pour vérifier la présence éventuelle d'impuretés pouvant nuire à la santé des oiseaux.

Préparation des oiseaux

19. Les oiseaux sont identifiés individuellement. L'acclimatation aux conditions d'essai et le régime alimentaire commencent au moins 14 jours avant l'administration des doses pour les oiseaux élevés en cage. Normalement, les oiseaux capturés dans la nature ont besoin d'une période d'acclimatation. Les oiseaux doivent tous être jugés en bonne santé et ils ne sont pas utilisés si plus de 5 % des oiseaux d'essai élevés en captivité ou plus de 10 % des oiseaux d'essai sauvages meurent pendant la période d'acclimatation. Si les oiseaux sauvages ne s'acclimatent pas, ils sont relâchés près de leur lieu de capture. Il convient d'éviter autant que possible d'utiliser des oiseaux capturés dans la nature, pour des raisons qui touchent à la protection des animaux, à des considérations de protection de la faune sauvage et de l'environnement naturel, et à des variables non contrôlées telles que l'âge, la constitution génétique et l'état de santé. La capture, le transport et le confinement sont associés à un stress extrême et peuvent entraîner une mortalité accrue des oiseaux. Il convient que les oiseaux élevés en captivité soient à peu près du même âge.

Préparation et administration des doses

20. Le produit chimique testé est placé dans une capsule, dissout ou mise en suspension dans un véhicule approprié, puis administrée par gavage. Si le produit chimique testé est dissout ou mis en suspension, il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu une solution ou une suspension aqueuse, puis une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu une dissolution dans d'autres véhicules. Pour les véhicules autres que l'eau, la toxicité du véhicule doit être connue, et ce dernier ne doit pas provoquer de régurgitation. La dose à administrer à chaque oiseau est déterminée en fonction du poids corporel mesuré au cours des 24 heures précédant l'administration.

21. Le produit chimique testé est administré en une seule fois par gavage. Le volume administré doit être le plus faible possible et doit rester constant par rapport au poids corporel et ne dépasse pas

² Par exemple, la Recommandation de la Commission Européenne 2007/526/CE

10 ml/kg de poids corporel. Il convient de faire jeûner les oiseaux pendant 12 à 15 heures durant la nuit qui précède l'administration du produit chimique testé. Ce jeûne de toute une nuit est recommandé pour les plus gros oiseaux tels que le colin de Virginie et la caille du Japon. Des périodes de jeûne plus courtes de deux heures conviennent pour les oiseaux d'environ 50 g ou moins. Une nuit de jeûne peut en effet être nocive pour les oiseaux de faible masse corporelle (12).

22. La régurgitation compromet l'évaluation de la toxicité et est enregistrée. L'addition d'un colorant alimentaire non toxique contrastant avec la couleur des déjections permet de constater plus facilement s'il y a eu régurgitation (FD&C Blue#1, Formule 773389, CAS 57-55-6). La régurgitation est une caractéristique des essais de toxicité orale aiguë chez les oiseaux et peut être liée à la technique de dosage ou aux caractéristiques du produit chimique testé. La fréquence de régurgitation peut être réduite en diminuant le volume administré ou en modifiant le véhicule. Il est conseillé, notamment pour les études sur des passereaux, d'effectuer un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai afin d'évaluer la propension de l'espèce à régurgiter. La fréquence de régurgitation peut être réduite en diminuant le volume administré, en utilisant des capsules ou en modifiant le véhicule. Si le problème de régurgitation persiste, on peut devoir envisager de recourir à une autre espèce. Si la seule option restante consiste à réaliser l'étude malgré la propension de l'espèce à régurgiter la dose, il peut se révéler impossible de déterminer la valeur exacte de la DL_{50} . La seule conclusion possible peut être que la DL_{50} est supérieure au niveau le plus bas n'ayant provoqué ni régurgitation ni décès.

Observation des oiseaux

23. Les oiseaux sont observés en continu pendant les deux premières heures qui suivent l'administration de la substance à tester pour voir s'ils régurgitent ou déceler d'éventuels signes cliniques, puis au minimum à trois autres occasions également espacées pendant la période de clarté du jour d'exposition afin de déceler d'éventuels signes cliniques, et au minimum une fois par jour par la suite pendant un total de 14 jours. Toutefois, la durée de la période d'observation n'est pas fixée d'une manière rigide. Les observations se poursuivent jusqu'à ce que les signes cliniques et la mortalité cessent de progresser. Si la période d'observation est prolongée à l'une des étapes, elle l'est également pour toutes les étapes ultérieures.

24. Les observations faites sur chaque individu portent sur la régurgitation, les signes d'intoxication et de rémission, les comportements anormaux, le poids corporel, la mortalité et le temps précédant la mort.

25. Les décès visiblement sans lien avec le traitement (blessures physiques, par exemple) doivent être exclus des calculs. Si un décès accidentel survient dans le groupe témoin, d'autres oiseaux témoins peuvent devoir être utilisés.

26. Les oiseaux sont pesés avant l'administration de la substance d'essai, puis 3, 7 et 14 jours après (ou plus tard selon la durée de l'étude) pour déterminer les variations de poids. La consommation alimentaire est mesurée quotidiennement jusqu'au 3^e jour, puis pour les périodes du 3^e au 7^e jour et du 7^e au 14^e jour après l'administration de la substance d'essai. A la fin de l'essai, un examen anatomo-pathologique est effectué sur tous les oiseaux de chaque groupe traité, y compris les témoins et les oiseaux non décédés pendant l'étude, afin d'identifier les éventuels décès accidentels et signes de toxicité manifestes. Si aucun décès ni aucun signe clinique significatif ne sont observés, il n'est pas nécessaire d'effectuer un examen post mortem des oiseaux.

27. Au cours de l'essai, les animaux présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sont euthanasiés immédiatement (10).

PROCÉDURE

Essai de dose limite

28. L'essai de dose limite consiste à administrer simultanément la dose limite à cinq animaux, et un placebo aux oiseaux témoins. Les procédures et calendriers applicables aux oiseaux témoins sont décrits aux paragraphes 44-45. Les oiseaux sont ensuite observés pendant 14 jours. La figure 1 décrit la procédure à suivre selon la mortalité observée. L'euthanasie pratiquée pour empêcher un oiseau d'endurer les effets toxiques est considérée comme équivalente à l'observation d'une mortalité due au traitement.

29. Si aucun des oiseaux ayant reçu la dose ne décède dans les 14 jours qui suivent l'administration de celle-ci, on peut conclure avec un intervalle de confiance de 95 % que la DL_{50} est supérieure à la dose limite. L'essai est achevé. L'essai de dose limite a échoué si l'on ne peut conclure avec un intervalle de confiance de 95 % que la DL_{50} est supérieure à la dose limite, et il convient alors de passer à l'étape 1 ou à l'étape 2 de l'essai séquentiel.

30. Si un décès dû au traitement est observé, et qu'aucun signe de toxicité n'apparaît chez les autres oiseaux, on peut administrer la dose limite à cinq oiseaux supplémentaires ou, à la discrétion du directeur et du pilote de l'étude, passer à l'étape 2 de la procédure séquentielle. Une autre dose peut être administrée avant la fin de la période d'observation de 14 jours. Si l'essai de dose limite est prolongé, qu'il y a un seul décès et qu'aucun signe clinique de toxicité n'est observé parmi les dix oiseaux, on peut conclure avec un intervalle de confiance de 95 % que la DL_{50} est supérieure à la dose limite et que l'étude de toxicité est achevée.

31. Si l'on observe que le traitement provoque le décès d'un oiseau sur cinq et que les autres oiseaux présentent des signes de toxicité, ou que le traitement entraîne le décès de deux à quatre oiseaux sur cinq, ou qu'au moins deux oiseaux sur dix décèdent, il convient d'appliquer la procédure séquentielle décrite ci-dessous et représentée à la figure 2, en commençant par l'étape 2.

32. Si la mortalité est totale (c'est-à-dire que tous les oiseaux sont morts, en tenant compte des oiseaux euthanasiés), il convient d'appliquer la procédure séquentielle représentée à la figure 2, en commençant par l'étape 1. Une autre dose peut être administrée avant la fin de la période d'observation de 14 jours.

33. Pour passer de l'essai de dose limite à l'étape 2 de la procédure séquentielle, il faut disposer d'une estimation provisoire de la DL_{50} afin de déterminer les doses pour l'étape 2. A partir des estimations provisoires de la DL_{50} figurant au tableau 1, établies pour une dose limite de 2 000 mg/kg-pc, il est possible de calculer les doses faibles et les doses fortes ainsi que décrit au paragraphe 40. On trouvera à l'annexe 4 la description d'une méthode permettant de calculer l'estimation provisoire de la DL_{50} en cas d'échec de l'essai de dose limite, quelle que soit cette dose limite.

34. Notons que, dans certaines circonstances, il n'est pas possible d'estimer la DL_{50} sans utiliser des doses supérieures à la dose limite. Étant donné les contraintes liées à l'utilisation de doses très élevées de produit chimique testé, on ne pourra pas toujours estimer la DL_{50} pour les produits chimiques testés peu toxiques.

Tableau 1 : Estimation provisoire de la DL_{50} , devant servir à l'étape 2 des essais séquentiels, déterminée en fonction de la mortalité lors d'un essai de dose limite à 2 000 mg/kg-pc

Mortalité (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Estimation provisoire de la DL ₅₀	3 606	2 944	2 541	2 244	2 000	1 782	1 574	1 358	1 109

Essai de détermination de la DL₅₀ seule et essai de détermination de la pente de la DL₅₀

Généralités

35. La détermination des doses pour chaque étape des essais séquentiels est détaillée ci-dessous. Un logigramme présentant l'enchaînement détaillé des opérations à effectuer pour les oiseaux recevant les doses est représenté à la figure 2. Un calendrier type d'essai séquentiel en quatre étapes, comportant chacune une période d'observation de 14 jours, est représenté à la figure 3. Les procédures et calendriers applicables aux oiseaux témoins sont décrits aux paragraphes 44-45.

36. L'estimation initiale de la DL₅₀ peut être fondée sur une connaissance préalable de la toxicité du produit chimique testé (essais de toxicité chez les mammifères, par exemple) ou sur d'autres composés de la même classe chimique. A chaque étape de l'étude, *ldose*, *hdose* et *step* doivent être recalculés pour déterminer la séquence de doses pour l'étape en question (voir l'annexe 2 pour les définitions).

37. L'estimation par la méthode du maximum de vraisemblance (EMV) est une procédure qui permet d'inférer, pour un modèle, les paramètres avec lesquels la probabilité d'obtenir des résultats correspondant aux observations est maximale. Pour la présente Ligne directrice, les paramètres déterminés sont la pente et la constante du modèle probit, dont les valeurs sont utilisées pour calculer la DL₅₀. Pour utiliser l'EMV, il faut avoir au moins deux décès partiels ou au moins deux revirements (voir paragraphe 38). Si ces conditions sont réunies, l'utilisation de la procédure séquentielle permettra d'estimer la DL₅₀ et la pente par la méthode EMV à partir des résultats des études réalisées aux étapes 1 et 2 (s'il y a eu au moins deux revirements) et aux étapes ultérieures (s'il y a eu au moins deux décès partiels ou au moins deux revirements).

38. La détermination des revirements et des décès partiels est essentielle pour identifier correctement l'étape suivante de l'essai. Les revirements (c'est-à-dire les cas où le pourcentage de mortalité à une dose donnée est plus élevé que le pourcentage de mortalité à la dose supérieure suivante) et les décès partiels (c'est-à-dire les cas où une seule dose étant administrée à plusieurs oiseaux, la mortalité est strictement comprise entre 0 et 100 % à cette dose) servent de critères pour passer à l'étape suivante ou arrêter (mettre fin à) l'essai. Il est recommandé de commencer par compter le nombre de décès partiels puis, si nécessaire, le nombre de revirements. On trouvera à l'annexe 3 des exemples de résultats d'essai hypothétiques présentant des décès partiels et des revirements.

Description détaillée de la procédure séquentielle

Pour un aperçu des règles d'arrêt, consulter les paragraphes 7 et 8 et les figures 1 et 2. Pour une description de la procédure séquentielle, consulter l'annexe 1. Pour les définitions, consulter l'annexe 2.

Étape 1 – Quatre doses également espacées sur une échelle logarithmique autour de l'estimation initiale de la DL₅₀

39. Le calcul de *ldose*, *hdose* et *step* à l'étape 1 s'effectue comme suit :

- (1) Calculer la dose de substance la plus forte et la plus faible (respectivement $hdose$ et $ldose$) en utilisant les équations suivantes où l'estimation initiale de la DL_{50} est basée sur les valeurs de DL_{50} obtenues lors d'essais de toxicité pratiqués sur des rongeurs ou d'autres espèces, ou sur les valeurs du tableau 1 en cas d'échec de l'essai de dose limite (on trouvera à l'annexe 4 des estimations de la DL_{50} pour une dose limite autre que 2 000 mg/kg-pc) :

$$ldose = dose1 = 0.1414 \times (\text{estimation initiale de la } DL_{50}) \text{ et}$$

$$hdose = dose4 = 7.071 \times (\text{estimation initiale de la } DL_{50})$$

- (2) Si $hdose > 3\,330$, fixer $hdose$ à 3 330 (ou une valeur plus faible en cas de contraintes physiques) et recalculer la dose la plus faible telle que $ldose = hdose / 50$

- (3) Calculer : $step = 50^{1/3} = 3.679$

- (4) Calculer la deuxième et la troisième dose:

$$dose2 = ldose \times step \text{ et}$$

Error! Objects cannot be created from editing field codes.

- (5) Administrer une dose ($dose1$, $dose2$, $dose3$, $dose4$) à chacun des quatre oiseaux.

- (6) Observer les oiseaux pendant une période (de trois jours, en général) et noter pour chaque oiseau s'il est mort ou vif. Calculer une estimation provisoire de la DL_{50} , définie comme la moyenne géométrique des doses qui provoquent le passage de survie à trépas (voir tableau 2). Cette estimation provisoire de la DL_{50} sera utilisée pour établir les doses pour l'étape 2.

- (7) Poursuivre l'observation des oiseaux pendant onze jours de plus (soit 14 jours au total).

- (8) Si les informations obtenues au bout de trois jours indiquent que d'autres décès peuvent survenir à cette étape de l'essai, le calcul de l'estimation provisoire de la DL_{50} peut être reporté jusqu'à ce que les oiseaux restants aient visiblement récupéré. Dans certains cas, il peut être nécessaire d'attendre jusqu'à 14 jours avant de passer à l'étape suivante. Si la période d'observation qui précède le calcul de l'estimation provisoire de la DL_{50} est prolongée pour cette étape, elle le sera également pour toutes les étapes ultérieures. En cas d'effets différés au bout de 14 jours, la durée de l'étape peut encore être prolongée.

Tableau 2 : Calcul de la DL₅₀ provisoire à partir des quatre doses de l'étape 1 ^{a, b}

<i>dose1</i>	<i>dose2</i>	<i>dose3</i>	<i>dose4</i>	DL ₅₀ provisoire calculée à partir des données de l'étape 1
O	O	O	O	$(dose4 \times dose5)^{1/2}$
O	O	O	X	$(dose3 \times dose4)^{1/2}$
O	O	X	O	$(dose2 \times dose3 \times dose4 \times dose5)^{1/4} = (dose3 \times dose4)^{1/2}$
O	X	O	O	$(dose1 \times dose2 \times dose4 \times dose5)^{1/4} = dose3$
X	O	O	O	$(dose0 \times dose1 \times dose4 \times dose5)^{1/4} = (dose2 \times dose3)^{1/2}$
O	O	X	X	$(dose2 \times dose3)^{1/2}$
O	X	X	O	$(dose1 \times dose2 \times dose4 \times dose5)^{1/4} = dose3$
X	X	O	O	$(dose0 \times dose1 \times dose4 \times dose5)^{1/4} = (dose2 \times dose3)^{1/2}$
O	X	O	X	$(dose1 \times dose2 \times dose3 \times dose4)^{1/4} = (dose2 \times dose3)^{1/2}$
X	O	X	O	$(dose0 \times dose1 \times dose2 \times dose3 \times dose4 \times dose5)^{1/6} = (dose2 \times dose3)^{1/2}$
X	O	O	X	$(dose0 \times dose1 \times dose3 \times dose4)^{1/4} = dose2$
O	X	X	X	$(dose1 \times dose2)^{1/2}$
X	O	X	X	$(dose0 \times dose1 \times dose2 \times dose3)^{1/4} = (dose1 \times dose2)^{1/2}$
X	X	O	X	$(dose0 \times dose1 \times dose3 \times dose4)^{1/4} = dose2$
X	X	X	O	$(dose0 \times dose1 \times dose4 \times dose5)^{1/4} = (dose2 \times dose3)^{1/2}$
X	X	X	X	$(dose0 \times dose1)^{1/2}$

^a O = survie et X = décès

^b Bien que quatre doses seulement (*dose1* à *dose4*) soient utilisées dans l'essai, les valeurs utilisées dans le tableau pour la *dose0* et la *dose5* sont des valeurs calculées. Elles précèdent ou suivent d'un degré les doses d'essai réelles. Ainsi, $dose0 = dose1 / step$ et $dose5 = dose4 \times step$. La *dose0* est ajoutée au calcul de la DL₅₀ provisoire en cas de mortalité à la dose d'essai la plus faible, et la *dose5* est ajoutée en cas de survie à la dose d'essai la plus forte.

Étape 2 – Dix doses également espacées sur une échelle logarithmique autour de l'estimation provisoire de la DL₅₀ obtenue à l'étape 1, ou lors d'un essai de dose limite avec mortalité partielle

40. Le calcul de *ldose*, *hdose* et *step* à l'étape 2 s'effectue comme suit:

- (1) Calculer la dose de substance la plus forte et la plus faible (respectivement $hdose$ et $ldose$) en utilisant les équations suivantes où la DL_{50} provisoire est basée sur les résultats de l'étape 1, sur les valeurs du tableau 1 en cas d'échec de l'essai de dose limite (on trouvera à l'annexe 4 des estimations de la DL_{50} pour une dose limite autre que 2 000 mg/kg-pc) ou sur les résultats combinés de l'essai de dose limite et de l'étape 1 :

$$ldose = dose1 = 0.3425 \times (DL_{50} \text{ provisoire}) \text{ et}$$

$$hdose = dose10 = 2.919 \times (DL_{50} \text{ provisoire})$$

- (2) Si $hdose > 3\,330$, fixer $hdose$ à 3 330 (ou une valeur plus faible en cas de contraintes physiques) et recalculer la dose la plus faible telle que $ldose = hdose / 8.5$
- (3) Calculer : $step = (hdose / ldose)^{1/9}$
- (4) Calculer les huit doses intermédiaires: $dose_i = ldose \times step^{(i-1)}$, pour $i = 2$ à 9
- (5) Administrer à chacun des dix oiseaux l'une des doses calculées.
- (6) Si un essai de détermination de la DL_{50} seule est réalisé, observer les oiseaux pendant un total de 14 jours. Estimer la DL_{50} avec le modèle probit en utilisant les données finales obtenues aux étapes 1 et 2, et les données issues de l'essai de dose limite (le cas échéant).
- (7) Si un essai de détermination de la pente de la DL_{50} est réalisé, observer les oiseaux pendant une période (de trois jours en général, ou plus longtemps si une période plus longue a été utilisée pour une étape précédente ou en cas de mortalité différée), et noter pour chaque oiseau s'il est mort ou vif. On compte le nombre de revirements (c'est-à-dire les cas où le pourcentage de mortalité à une dose donnée est plus élevé que le pourcentage de mortalité à la dose supérieure suivante ; voir exemples à l'annexe 3), et on fait tourner un modèle probit au moyen des données de mortalité combinées provenant de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1 et 2 pour obtenir une estimation provisoire de la DL_{50} et, si possible, de la pente. Si deux revirements ou plus sont observés, passer à l'étape 3a, sinon passer à l'étape 3b.
- (8) Poursuivre l'observation des oiseaux pendant onze jours de plus (soit 14 jours au total).
- (9) Si les informations obtenues au bout de trois jours indiquent que d'autres décès peuvent survenir à cette étape de l'essai, le calcul de l'estimation provisoire de la DL_{50} peut être reporté jusqu'à ce que les oiseaux d'essai restants aient visiblement récupéré. Dans certains cas, il peut être nécessaire d'attendre jusqu'à 14 jours avant de passer à l'étape suivante. Si la période d'observation qui précède le calcul de la DL_{50} provisoire est prolongée pour cette étape, elle le sera également pour toutes les étapes ultérieures. En cas d'effets différés au bout de 14 jours, la durée de l'étape peut encore être prolongée.

Étape 3a – (deux revirements ou plus si l'on combine les résultats de l'essai de dose limite et ceux des étapes 1 et 2) Deux doses également espacées sur une échelle logarithmique autour de l'estimation provisoire de la DL_{50} obtenue à partir de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1 et 2

41. Le calcul de $ldose$, $hdose$ et $step$ à l'étape 3a s'effectue comme suit:

- (1) Si l'estimation provisoire de la pente ci-dessus est supérieure à quinze ou inférieure à un, fixer la pente provisoire respectivement à quinze ou à un et recalculer $ldose$ et $hdose$. Si aucune estimation provisoire de la pente n'a été obtenue, fixer la pente provisoire à 5 pour le calcul de $ldose$ et $hdose$.

- (2) Calculer la dose de substance la plus forte et la plus faible (respectivement $hdose$ et $ldose$) en utilisant les équations suivantes où les valeurs provisoires de la DL_{50} et de la pente sont basées sur toutes les données disponibles à ce stade (essai de dose limite, étape 1 et/ou étape 2) :

$$ldose = 10^{(-1.036 / \text{pente provisoire})} \times DL_{50} \text{ provisoire et}$$

$$hdose = 10^{(1.036 / \text{pente provisoire})} \times DL_{50} \text{ provisoire}$$

- (3) Si $hdose > 3\,330$, fixer $hdose$ à 3 330 (ou une valeur plus faible en cas de contraintes physiques) et recalculer la dose la plus faible telle que $ldose = hdose / 10^{(2.072 / \text{pente})}$
- (4) Administrer $ldose$ à cinq oiseaux et $hdose$ à cinq oiseaux, soit 10 oiseaux au total ayant reçu une dose.
- (5) Observer les oiseaux pendant 14 jours et noter pour chaque oiseau s'il est mort ou vif. Faire tourner un modèle probit avec les données de mortalité combinées provenant de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1, 2 et 3a pour obtenir une estimation finale de la DL_{50} et de la pente. L'essai est terminé.
- (6) Si les données ne fournissent pas de solution au modèle probit, le noter et estimer la DL_{50} définie comme la moyenne géométrique des doses situées de part et d'autre de la région où l'on constate une mortalité de 50 %. Il est aussi possible de recourir à d'autres méthodes d'interpolation et à des moyennes mobiles pour estimer la DL_{50} .

Étape 3b – (moins de deux revirements si l'on combine les résultats de l'essai de dose limite et ceux des étapes 1 et 2) Cinq doses également espacées sur une échelle logarithmique autour de l'estimation provisoire de la DL_{50} obtenue à partir de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1 et 2

42. Le calcul de $ldose$, $hdose$ et $step$ à l'étape 3b s'effectue comme suit:

- (1) Calculer la dose de substance la plus forte et la plus faible (respectivement $hdose$ et $ldose$) en utilisant les équations suivantes où la DL_{50} provisoire est basée sur tous les résultats disponibles à ce stade (essai de dose limite, étape 1 et/ou étape 2):

$$ldose = dose1 = 0.6205 \times DL_{50} \text{ provisoire et}$$

$$hdose = dose5 = 1.6113 \times DL_{50} \text{ provisoire}$$

- (2) Si $hdose > 3\,330$, fixer $hdose$ à 3 330 (ou une valeur plus faible en cas de contraintes physiques) et recalculer la dose la plus faible telle que $ldose = hdose / 2.6$
- (3) Calculer : $step = (hdose / ldose)^{1/4}$
- (4) Calculer les trois doses intermédiaires: $dose_i = ldose \times step^{(i-1)}$, pour $i = 2$ à 4
- (5) Administrer chacune des cinq doses à deux oiseaux, soit 10 oiseaux au total ayant reçu une dose.
- (6) Observer les oiseaux pendant une période (de trois jours en général, ou plus longtemps si une période plus longue a été utilisée pour une étape précédente ou en cas de mortalité différée), et noter pour chaque oiseau s'il est mort ou vif. Faire tourner un modèle probit avec les données de

mortalité combinées provenant de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1, 2 et 3b pour obtenir une estimation provisoire de la DL_{50} et de la pente.

- (7) Si au moins deux revirements ou au moins deux décès partiels sont observés et qu'une estimation provisoire de la pente a été obtenue, l'étape 4 est inutile. Poursuivre l'observation des oiseaux jusqu'à la fin du 14^e jour et faire tourner un modèle probit avec les données de mortalité combinées provenant de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1, 2 et 3b pour obtenir une estimation finale de la DL_{50} et de la pente. L'essai est terminé.
- (8) Si les conditions du point (7) ci-dessus ne sont pas remplies, passer à l'étape 4.
- (9) Poursuivre l'observation des oiseaux pendant onze jours de plus (soit 14 jours au total).
- (10) Si les informations obtenues au bout de trois jours indiquent que d'autres décès peuvent survenir à cette étape de l'essai, le calcul de l'estimation provisoire de la DL_{50} peut être reporté jusqu'à ce que les oiseaux d'essai restants aient visiblement récupéré. Dans certains cas, il peut être nécessaire d'attendre jusqu'à 14 jours avant de passer à l'étape suivante. Si la période d'observation précédant le calcul de la DL_{50} provisoire est prolongée pour cette étape, elle le sera également pour toutes les étapes ultérieures. En cas d'effets différés au bout de 14 jours, la durée de l'étape peut encore être prolongée.

Étape 4 – Cinq doses également espacées sur une échelle logarithmique autour de l'estimation provisoire de la DL_{50} obtenue à partir de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1, 2 et 3b

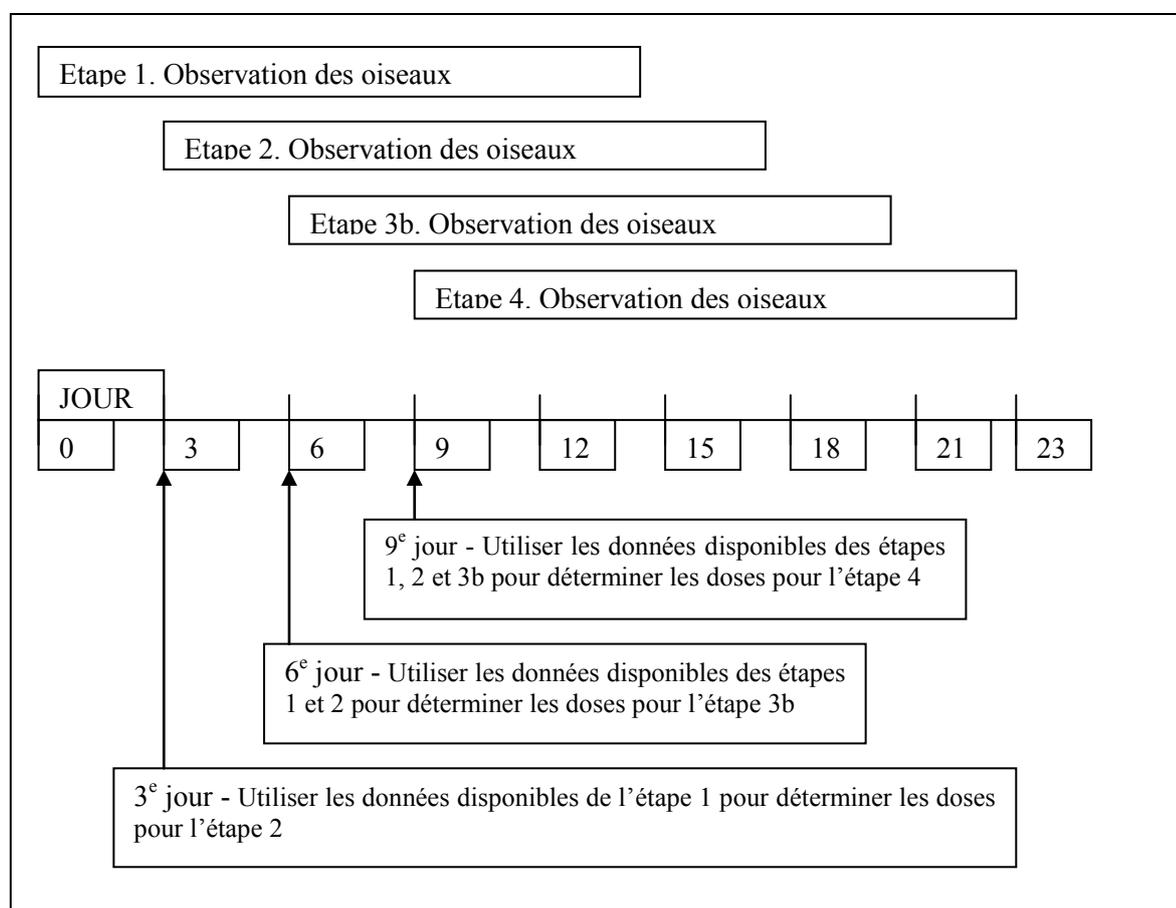
43. Le calcul de *ldose*, *hdose* et *step* à l'étape 4 s'effectue comme suit:

- (1) Calculer la dose de substance la plus forte et la plus faible (respectivement *hdose* et *ldose*) en utilisant les équations suivantes où la DL_{50} provisoire est basée sur tous les résultats disponibles à ce stade (essai de dose limite, étape 1, étape 2 et/ou étape 3b) :

$$ldose = dose1 = 0.6205 \times DL_{50} \text{ provisoire}$$
 et

$$hdose = dose5 = 1.6113 \times DL_{50} \text{ provisoire}$$
- (2) Si $hdose > 3\,330$, fixer *hdose* à 3 330 (ou une valeur plus faible en cas de contraintes physiques) et recalculer la dose la plus faible telle que $ldose = hdose / 2.6$
- (3) Calculer : $step = (hdose / ldose)^{1/4}$
- (4) Calculer les trois doses intermédiaires : $dosei = ldose \times step^{(i-1)}$, pour $i = 2$ à 4
- (5) Administrer chacune des cinq doses à deux oiseaux, soit 10 oiseaux au total ayant reçu une dose.
- (6) Observer les oiseaux pendant 14 jours et noter pour chaque oiseau s'il est mort ou vif. Faire tourner un modèle probit avec les données combinées provenant de l'essai de dose limite (le cas échéant) et des étapes 1, 2, 3b et 4 pour obtenir une estimation finale de la DL_{50} et de la pente. L'essai est terminé.
- (7) Si, à l'issue de l'étape 4, aucune estimation par la technique du maximum de vraisemblance ne peut être obtenue, le noter et estimer la DL_{50} , définie comme la moyenne géométrique des doses des deux côtés de la région où l'on constate une mortalité de 50 %. Il est aussi possible de recourir à d'autres méthodes d'interpolation et à des moyennes mobiles pour estimer la DL_{50} .

Figure 3 : Calendrier type d'essai séquentiel en quatre étapes (étapes 1, 2, 3b et 4), comportant chacune une période d'observation de 14 jours ; le diagramme n'inclut pas les oiseaux témoins



Oiseaux témoins

44. Cinq oiseaux témoins non traités, issus de la même couvée, sont utilisés dans l'essai. Les oiseaux témoins reçoivent un placebo administré avec le même véhicule (ou la même capsule) que pour le produit chimique testé et sont maintenus dans les mêmes conditions que les oiseaux traités. Les oiseaux témoins sont pesés avant l'administration du placebo ainsi que les 3^e, 7^e et 14^e jours. Le placebo est administré le même jour que la première administration du produit chimique testé (lors de l'essai de dose limite s'il a lieu et/ou de l'étape de début (étape 1 ou 2) de l'essai séquentiel).

45. Dans certaines circonstances dues à la conduite de l'essai, cinq oiseaux témoins supplémentaires peuvent être nécessaires:

- Si, au début d'une nouvelle étape de l'essai, on a recours à des oiseaux issus d'une autre couvée que celle initialement utilisée pour l'essai, il y a lieu d'inclure le jour-même des oiseaux témoins provenant de cette seconde couvée;
- Si les oiseaux reçoivent des volumes de substance différents selon les étapes, les oiseaux témoins reçoivent le placebo au moment où les oiseaux d'essai reçoivent le volume de substance différent.

Cela peut se produire lorsqu'il est nécessaire d'augmenter la dose d'essai la plus forte et qu'il faut alors un volume plus important pour obtenir une solution/suspension appropriée;

- Si un essai de détermination de la pente de la DL_{50} est réalisé et que le temps entre le début de chaque étape est long ou varie notablement (passe de trois à 10 jours, par exemple), des oiseaux doivent recevoir le placebo et être ajoutés à l'essai au milieu de l'étude séquentielle (au début de l'étape 2 ou 3, par exemple).

RESULTATS ET RAPPORT D'ESSAI

Résultats

46. Les résultats individuels sont résumés sous la forme de tableaux faisant apparaître la dose, le nombre d'oiseaux utilisés, les manifestations de toxicité, la mortalité, le nombre d'animaux euthanasiés pour des raisons humanitaires, le moment de la mort de chaque oiseau, l'enregistrement du moment de l'apparition et de la disparition des signes cliniques, les poids corporels (juste avant l'administration des doses, les 3^e, 7^e et 14^e jours et à la fin de l'essai si ce dernier dure plus de 14 jours, la période d'observation ayant été prolongée en raison de la mortalité différée, de la consommation alimentaire et des résultats de l'examen anatomo-pathologique.)

Calcul de la DL_{50} , de la pente et des intervalles de confiance

47. Les méthodes de calcul utilisées pour estimer la DL_{50} (dose létale médiane) sont les mêmes pour les essais séquentiels que pour d'autres types d'essais dose-effet. Certaines caractéristiques de cette procédure séquentielle reposent sur l'hypothèse selon laquelle la forme de la courbe dose-effet correspond au modèle probit de sorte que l'utilisation d'un modèle de régression probit (le logarithme de dose représentant la variable indépendante) est appropriée pour estimer la DL_{50} . Pour le modèle probit, l'EML de Log (DL_{50}) est $-a/b$, où a est la constante et b la pente. Lorsque les données de mortalité issues de toutes les étapes d'une étude sont regroupées aux fins d'analyse, d'autres modèles peuvent également être appropriés si le modèle probit ne correspond pas de manière adéquate aux données.

48. Les méthodes standard du *maximum de vraisemblance* utilisées pour faire tourner les modèles ne peuvent être utilisées que si deux doses entraînent une mortalité partielle ou si l'on constate deux revirements parmi les réponses observées. Ces conditions sont intégrées à la procédure séquentielle et il est rare qu'elles ne soient pas remplies. S'il n'est pas possible d'obtenir une estimation par maximum de vraisemblance, le noter et déterminer la DL_{50} , définie comme la moyenne géométrique des doses situées de part et d'autre de la région où l'on constate une mortalité de 50 %. Il est aussi possible de recourir à d'autres méthodes d'interpolation et à des moyennes mobiles pour estimer la DL_{50} .

49. Les intervalles de confiance pour la DL_{50} peuvent être déterminés par le théorème de Fieller (6), les méthodes du rapport de vraisemblance (7) (8) ou des méthodes binomiales (9). De nombreux logiciels intègrent des routines de calcul statistique pour estimer la DL_{50} et son intervalle de confiance (SAS®, LogXact®, par exemple).

50. On admettra qu'il est souvent possible de calculer la pente et les intervalles de confiance pour la DL_{50} à partir des résultats de l'essai de détermination de la DL_{50} seule. Toutefois, étant donné le nombre restreint d'oiseaux et l'absence de réplication aux différentes doses, la fiabilité de ces estimations peut s'avérer incertaine. Ainsi, la pente et les intervalles de confiance pour la DL_{50} sont enregistrés seulement pour l'essai de détermination de la pente de la DL_{50} . Une mesure de la qualité d'ajustement du modèle de

régression (qualité d'ajustement de Pearson, khi carré du rapport de vraisemblance, par exemple) est notée pour chaque essai dose-effet. L'indication d'une mesure de la qualité d'ajustement est optionnelle pour l'essai de détermination de la DL₅₀ seule.

51. Un programme Microsoft® Excel appelé *SEquential DEsign Calculator (SEDEC)* est disponible sur le site Internet de l'OCDE pour faciliter la sélection des doses et l'analyse des études réalisées conformément à la Ligne directrice 223 de l'OCDE. La configuration minimale requise pour utiliser SEDEC est Microsoft® Excel pour Windows 2000.

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai contient au moins les informations suivantes pour confirmer la conformité avec la Ligne directrice et les résultats de l'essai:

Produit chimique testé : nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes :

Données d'identification chimique;

Substance mono-constituant :

- Apparence physique, hydro-solubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- Identification chimique, telle que désignation(s) 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. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :

- Caractérisées autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants

Méthode et système d'essai

- type d'essai
- espèce, origine, souche, âge, poids, état de santé des animaux d'essai
- description de la méthode d'essai

Conduite de l'essai

- groupes et conception de l'essai (nombre de traitements et de répliques, engagement individuel ou collectif)
- procédures d'acclimatation et d'affectation (durée, randomisation)
- méthode d'administration des doses (gavage/capsule, véhicule/solvant, volume/oiseau en % du poids corporel)
- conditions d'encagement (type, taille, matériaux constitutifs de l'enclos, revêtement de sol, température, humidité, photopériode, intensité lumineuse)
- alimentation et eau (mise à disposition, identification, source, composition, valeur calorique, résultats de l'analyse des contaminants)
- fréquence et durée des observations, méthode d'observation (santé/mortalité, poids corporel, consommation alimentaire)
- description des méthodes statistiques

Résultats de l'essai

- mortalité (temps léthal, symptômes cliniques, calcul de la DL_{50} , de la pente et des limites de confiance, s'il y a lieu)
- apparition et disparition des signes cliniques (en minutes)
- examen anatomo-pathologique
- données relatives au poids corporel individuel
- données relatives à la consommation alimentaire

BIBLIOGRAPHIE

LITERATURE

- (1) OCDE 1996. Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing, OECD Environmental Health and Safety Publication, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et évaluations No. 5, Monographie OECD/GD (96)166, disponible à: <http://www.oecd.org/env/testguidelines/>.
- (2) Chapman, P.F., R. Dark, T. A. Springer. 2007. Avian Acute Oral Toxicity: A Statistical Evaluation of Sequential Experimental Designs. [In preparation].
- (3) Tucker, R. K. and M. A. Haegele. 1971. Comparative acute oral toxicity of pesticides to six species of birds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 20:57-65.
- (4) Tucker, R. K. and D. G. Crabtree. 1970. Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife. Denver Wildlife Research Center Resource Publication No. 84.
- (5) Smith, Gregory J. 1987. Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorous and Carbamate Compounds. Resource Publication 170. USDI, Washington, DC 171pp.
- (3) Crump, K.S. and R. Howe. 1985. A review of methods for calculating confidence intervals in low dose extrapolation. In: D. Krewski, Ed. Toxicology and Risk Assessment. CRC Press. Canada.
- (5) Piegorsch, W. W. and A.J. Bailer. 1997. Statistics for environmental biology and toxicology. Chapman and Hall. London.
- (6) Fieller, E.C. 1940. The biological standardization of insulin. Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society, 7(1): 1-64.
- (7) Crump, K.S. and R. Howe. 1985. A review of methods for calculating confidence intervals in low dose extrapolation. In: D. Krewski, Ed. Toxicology and Risk Assessment. CRC Press. Canada.
- (8) Spruill, C. 1983. Kiefer-Wolfowitz Equivalence Theorem. In: Kotz, S. and Johnson, N.L., Eds. Encyclopedia of Statistical Sciences, Vol. 4. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- (9) Stephan, C. E. 1977. Methods for calculating an LC₅₀. Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM STP 634, In: F. L. Mayer and J. L. Hamelink, Eds. American Society for Testing and Materials, 65-84.
- (10) OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et évaluations No. 19, EN/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

- (11) Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (2007). Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. http://www.felasa.eu/media/uploads/Euroguide_official_publication.pdf.
- (12) Richard A. Zann, 1996. The Zebra Finch, a synthesis of field and laboratory studies. Oxford University Press, 1996, page 52.

ANNEXE 1**DESCRIPTION GÉNÉRALE, LOGIQUE ET
FONDEMENT STATISTIQUE DES ESSAIS SÉQUENTIELS****Fondement statistique**

1. Le principe de la distribution des tolérances repose sur l'idée qu'un oiseau mourra s'il reçoit une dose supérieure à une certaine valeur, mais survivra s'il reçoit une dose inférieure ou égale à cette valeur. Cette valeur spécifique, appelée « tolérance », est supposée fixe pour un individu mais variable pour l'ensemble des oiseaux. Ainsi, pour une population d'oiseaux, on peut déterminer la distribution des tolérances, ou distribution de tolérance.

2. Pour estimer la distribution de tolérance à partir d'un échantillon d'oiseaux, on utilise un modèle statistique. Dans l'hypothèse d'une distribution normale des tolérances, on obtient un modèle probit qui prend la forme suivante :

$$\text{Probit}(p) = \alpha + \beta \cdot \log(d)$$

où « p » est la probabilité que la tolérance d'un individu soit inférieure à la dose d (c'est-à-dire la probabilité qu'un oiseau recevant la dose d survive).

α et β sont des paramètres représentant la constante et la pente d'une droite exprimant la relation entre probit (p) et $\log(d)$.

3. On fait tourner le modèle probit avec les résultats de l'essai pour obtenir une estimation des paramètres α et β que nous appelons respectivement a et b. La moyenne de la distribution de tolérance de la population d'oiseaux (appelée DL_{50}) peut ensuite être déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Estimation } [\log(DL_{50})] = -a/b$$

Et la variance de la distribution de tolérance peut être estimée comme suit :

$$\text{Variance} = 1/b$$

4. Après estimation de la distribution de tolérance (c'est-à-dire une fois α et β obtenus), les centiles de la distribution peuvent être calculés (niveaux de dose correspondant à des valeurs spécifiques de p).

5. Des méthodes d'estimation de la DL_{50} , de la pente et des intervalles de confiance pour différents résultats d'essai sont recommandées en (2). La pente est estimée si l'on constate au moins deux décès partiels et/ou revirements.

6. Cette procédure comporte plusieurs étapes, consistant chacune à administrer simultanément la substance d'essai à plusieurs oiseaux, qui sont ensuite observés pendant une certaine période. L'avantage de ce type d'essai est que les données collectées aux étapes en amont, notamment les estimations provisoires de la DL_{50} et de la pente de la courbe dose-effet, aident à concevoir l'étape suivante, et notamment à sélectionner les doses. La conception générique peut être adaptée, notamment en ce qui concerne le nombre d'étapes, le nombre de doses par étape et le nombre d'oiseaux par dose. La conception spécifique décrite ici a été établie au moyen de simulations informatiques, et prévoit quatre oiseaux à la première étape et dix oiseaux aux étapes suivantes, tandis que le nombre de doses et le nombre d'oiseaux par dose varient selon les étapes.

7. Au début de l'essai, on suppose qu'une estimation initiale de la DL_{50} est disponible. En pratique, cette estimation peut être fondée sur une connaissance préalable des propriétés chimiques et de la toxicité de matières actives similaires ou sur les résultats d'essais réalisés sur d'autres espèces d'oiseaux ou sur des mammifères. Une autre solution consiste à déduire l'estimation initiale d'un essai de dose limite. Les trois premières étapes des essais séquentiels sont nettement différentes les unes des autres. La première sert à déterminer un ordre de grandeur, à confirmer et à affiner l'estimation initiale de la DL_{50} . La deuxième vise à situer plus précisément la DL_{50} . La troisième étape et toutes les étapes suivantes sont destinées à fournir des estimations de l'intervalle de confiance et de la pente de la courbe dose-effet ou à réduire encore l'incertitude relative à l'estimation de la DL_{50} .

8. L'administration des doses aux différentes étapes étant échelonnée, les estimations provisoires de la DL_{50} et de la pente sont recalculées plusieurs fois. A chaque nouveau calcul, le nombre de groupes présentant une mortalité partielle ou le nombre de revirements peuvent varier. Les estimations provisoires peuvent être obtenues les 3^e, 6^e et 9^e jours après le début de l'essai, mais à chaque étape les observations continuent jusqu'au 14^e jour. A la fin de l'étude, les estimations finales de la DL_{50} et de la pente (et des intervalles de confiance, s'il y a lieu) sont déterminées à partir de la combinaison de toutes les évaluations (c'est-à-dire de toutes les étapes) obtenues au bout de 14 jours.

9. A l'étape 1, quatre doses sont également espacées sur une échelle logarithmique autour de l'estimation initiale de la DL_{50} . Des simulations informatiques ont montré que quatre doses et un écart très important entre la dose la plus forte et la dose plus faible donnaient une estimation provisoire adéquate de la DL_{50} et préservaient les oiseaux pour les étapes ultérieures, au cours desquelles ils étaient plus utiles pour estimer la pente. Le calcul d'une estimation provisoire de la DL_{50} comme la moyenne géométrique des doses de transition présente plusieurs avantages. D'une part, il permet d'obtenir une estimation raisonnable à partir d'un minimum d'informations et, d'autre part, il peut être adapté pour fournir une estimation provisoire de la DL_{50} même en cas de décès à la dose la plus faible ou en cas de survie à la dose la plus forte.

10. L'objectif de l'étape 2 est d'affiner l'estimation de la DL_{50} et d'obtenir une estimation initiale de la pente. Pour que cette étape permette d'obtenir une estimation finale de la DL_{50} dans le cas de l'essai de détermination de la DL_{50} seule, et une estimation provisoire dans celui de l'essai de détermination de la pente de la DL_{50} , les doses extrêmes sont situées aux points correspondant à 1 % et 99 % de décès dans l'hypothèse d'une pente de cinq pour une distribution normale des tolérances avec une moyenne égale à la DL_{50} et un écart type égal à 1/pente. La raison du choix d'une valeur de cinq pour la pente est que selon la base de données ECOTOX de l'Agence pour la Protection de l'Environnement des États-Unis [<http://www.ipmcenters.org/ECotox/index.cfm>], l'historique des essais de pesticides soumis à l'Agence montre que la pente modale pour les essais aviaires aigus est de cinq.

11. L'objectif des étapes 3a et 3b est d'affiner et d'améliorer les estimations provisoires de la DL_{50} et de la pente obtenues à l'étape 2 afin de pouvoir obtenir des intervalles de confiance. L'étape 3a est recommandée lorsqu'on constate plus d'un revirement, signe que les informations sur la DL_{50} et sur la pente sont bonnes. L'étape 3b est recommandée lorsqu'il y a moins de deux revirements, signe que les informations sur la DL_{50} et la pente sont insuffisantes.

12. A l'étape 3a, des limites sont imposées aux estimations de la pente car les estimations par maximum de vraisemblance effectuées à l'aide d'un nombre restreint d'observations peuvent donner des valeurs extrêmes (probablement inexacts). La moitié des dix oiseaux se voient administrer la dose inférieure, correspondant à une mortalité de 15 %, et l'autre moitié la dose supérieure, correspondant à une mortalité de 85 %. La logique qui sous-tend la sélection de doses aux 15^e et 85^e centiles découle du concept statistique de D-optimalité (8). Cette forme d'optimalité donne les meilleures estimations simultanées de la DL_{50} et de la pente (au sens où elle minimise simultanément la largeur des intervalles de confiance pour la DL_{50} et pour la pente).

13. A l'étape 3b, la pente est supposée être de cinq, et les doses extrêmes sont sélectionnées de manière à correspondre à une mortalité de 15 % et 85 %. Outre la résolution d'un modèle probit, on dénombre les revirements et les décès partiels afin de prendre une décision concernant la stabilité de l'estimation de la DL_{50} obtenue à cette étape. Si au moins deux revirements et/ou deux décès partiels sont observés, l'étude peut être arrêtée.

14. L'étape 4 est similaire à l'étape 3b et vise à estimer la pente lorsque l'estimation obtenue à l'étape 3b est instable ou que les intervalles de confiance sont très larges. L'essai est terminé à l'issue de l'étape 4.

ANNEXE 2

DÉFINITIONS

Toxicité orale aiguë: désigne les effets néfastes survenant après l'administration par voie orale d'une dose unique d'un produit chimique testé, ou de plusieurs doses administrées en l'espace de 24 heures.

Dose: quantité de produit chimique testé administré. La dose est exprimée en poids (g, mg) ou en poids de produit chimique testé par unité de poids de l'animal d'expérience et par jour (par exemple, mg/kg de poids corporel, ou mg/kg-pc).

DL₅₀ (dose orale létale médiane) : dose unique d'un produit chimique testé, obtenue par calcul statistique, supposée entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La DL₅₀ s'exprime en poids du produit chimique testé par unité de poids de l'animal d'expérience (mg/kg-pc).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai.

Probit: abréviation de « *probability integral transformation* ». Un modèle probit de relation dose-effet permet d'analyser une distribution normale type des effets attendus (c'est-à-dire une distribution centrée sur sa moyenne entre plus et moins un écart-type) en fonction des doses (généralement en échelle logarithmique) comme si elle épousait une ligne droite dont la pente serait égale à l'inverse de l'écart-type. Une distribution normale type de létalité est symétrique ; par conséquent sa moyenne correspond également à sa vraie DL₅₀ ou réponse médiane.

Pente (de la courbe dose-effet): équivaut à l'angle entre la courbe dose-effet et l'axe des doses. Dans le cas d'une analyse probit, lorsque les effets sont exprimés en probits en fonction des logarithmes des doses, la courbe devient une droite dont la pente est l'inverse de l'écart-type des tolérances des animaux supposées être normalement distribuées.

Étape (d'une procédure séquentielle): période, au cours d'une expérience, durant laquelle un certain nombre d'oiseaux se voient administrer une dose simultanément, puis sont observés pendant un certain temps. Les estimations provisoires de la DL₅₀ et de la pente obtenues à l'étape précédente peuvent influencer sur la conception de l'étape en cours. De même, les résultats de l'étape en cours peuvent influencer sur la conception des étapes suivantes.

ldose: dose la plus faible utilisée au cours d'une étape (mg/kg-pc).

hdose: dose la plus forte utilisée au cours d'une étape (mg/kg-pc).

step: coefficient multiplicateur utilisé pour le calcul des doses individuelles.

Estimation initiale de la DL₅₀: estimation effectuée avant le début de l'étude, en fonction de laquelle sont choisies les quatre doses de l'étape 1.

Estimations provisoires de la DL₅₀ et de la pente: estimations effectuées avant la fin d'une étape et servant à déterminer les doses des étapes suivantes. En général, les estimations provisoires sont fondées sur les observations faites à toutes les étapes qui précèdent l'étape en cours et trois jours après le début de celle-ci.

Estimations finales de la DL₅₀ et de la pente: estimations effectuées à la fin de l'étude. Elles sont fondées sur les observations provenant de chaque étape achevée, normalement de 14 jours ou plus.

Mortalité partielle: lorsque la même dose est administrée à plusieurs oiseaux, il y a mortalité partielle si certains oiseaux meurent et d'autres survivent. On utilise aussi l'expression « décès partiels » ou « réponse partielle ».

Revirements: analogues à la mortalité partielle pour les individus non répliqués recevant une dose, ils touchent des paires consécutives d'oiseaux lorsque la réponse aux doses plus faibles est le décès et la réponse aux doses plus fortes est la survie. Ce phénomène peut se produire aux alentours de la DL₅₀. Par exemple, si zéro représente la survie et un le décès, et que les réponses sont classées selon l'ordre croissant des doses, alors des séquences telles que 0001011111 et 0001101111 présentent chacune un seul revirement, tandis que des séquences telles que 0001010111 et 00011010011 présentent chacune deux revirements. D'autres exemples sont présentés à l'annexe 3.

ANNEXE 3**DETERMINATION DU NOMBRE DE DECES PARTIELS ET DE REVIREMENTS**

Les revirements (c'est-à-dire les cas où le pourcentage de mortalité à une dose donnée est plus élevé que le pourcentage de mortalité à la dose supérieure suivante) et les décès partiels (cas où une seule dose étant administrée à plusieurs oiseaux, la mortalité est strictement comprise entre 0 et 100 % à cette dose) servent de critères pour passer à l'étape suivante ou arrêter (mettre fin à) l'essai. Il est recommandé de commencer par compter le nombre de décès partiels puis, si nécessaire, le nombre de revirements. Un revirement après un décès partiel est comptabilisé à la fois comme un revirement et comme un décès partiel.

On trouvera ci-dessous des exemples de résultats d'essais hypothétiques présentant des décès partiels et des revirements. Dans ces exemples, les doses augmentent de gauche à droite, les décès partiels sont indiqués par un astérisque (*) et les revirements sont notés en gras dans les cellules grisées.

Exemple 1. Etape 2 ($n_{\text{oiseaux}} = n_{\text{étape1}} + n_{\text{étape2}} = 4 + 10$, nombre de doses uniques = 14)

0 décès partiel, 2 revirements, passer à l'étape 3a.

Nombre de décès	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Nombre d'individus soumis à l'essai	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pourcentage (%) de décès	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	100	100	100	100

Exemple 2. Etape 2 ($n_{\text{oiseaux}} = n_{\text{étape1}} + n_{\text{étape2}} = 4 + 10$, nombre de doses uniques = 12, la dose la plus faible et la dose la plus forte étant les mêmes que pour l'étape 1, limites minimales et maximales à 66.6 et 3 330 mg/kg-pc)

0 décès partiel, 1 revirement, passer à l'étape 3b.

Nombre de décès	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	2
Nombre d'individus soumis à l'essai	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Pourcentage (%) de décès	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100	100

Exemple 3. Etapes 1, 2 et 3b ($n_{\text{oiseaux}} = n_{\text{étape1}} + n_{\text{étape2}} + n_{\text{étape3b}} = 4 + 10 + 10$, nombre de doses uniques = 19)

2 décès partiels, 3 revirements, essai terminé

Nombre de décès	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	2	0	1	1	1	1
Nombre d'individus soumis à l'essai	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Pourcentage (%) de décès	0	0	0	50*	0	0	0	50*	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100

Exemple 4. Étapes 1, 2 et 3b ($n_{\text{oiseaux}} = n_{\text{étape1}} + n_{\text{étape2}} + n_{\text{étape3b}} = 4 + 10 + 10$, nombre de doses uniques = 19)
 1 décès partiel, 2 revirements, essai terminé

Nombre de décès	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1	2	0	1	1	1	1
Nombre d'individus soumis à l'essai	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Pourcentage (%) de décès	0	0	0	0	0	0	0	50*	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100

Exemple 5. Étapes 1, 2 et 3b ($n_{\text{oiseaux}} = n_{\text{étape1}} + n_{\text{étape2}} + n_{\text{étape3b}} = 4 + 10 + 10$, nombre de doses uniques = 19)
 1 décès partiel, 1 revirement, passer à l'étape 4

Nombre de décès	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	2	1	1	2	0	1	1	1	1
Nombre d'individus soumis à l'essai	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Pourcentage (%) de décès	0	0	0	0	0	50*	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100

ANNEXE 4

**CALCUL D'UNE DL₅₀ PROVISOIRE
EN CAS DE MORTALITE DANS UN ESSAI DE DOSE LIMITE**

Le tableau 1 de la présente Ligne directrice illustre les estimations provisoires de la DL₅₀ qui peuvent servir à calculer les doses utilisées pour l'étape 2 de l'essai séquentiel si un essai de dose limite a eu lieu et qu'une mortalité partielle a été observée parmi les oiseaux expérimentaux. Toutefois, ce tableau n'est utile que si la dose limite était de 2 000 mg/kg-pc. Si une autre dose limite a été utilisée, une estimation provisoire de la DL₅₀ peut être déterminée comme suit :

$$DL_{50} = 10^{\left(\frac{\text{probit}_p - 5}{5} + \log_{10}(\text{dose limite}) \right)}$$

où p est la proportion de décès observée et probit_p l'une des valeurs du tableau 3. Pour ce calcul, la pente est supposée être de 5.

Tableau 3 : Valeurs probit pour différentes proportions de décès

Mortalité (proportion)	1/10	2/10 ou 1/5	3/10	4/10 ou 2/5	5/10	6/10 ou 3/5	7/10	8/10 ou 4/5	9/10
Probit	3.72	4.16	4.48	4.75	5.00	5.25	5.52	5.84	6.28