Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 403
Toxicité aiguë par inhalation



25 juin 2024

Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques

OCDE
DES POLITIQUES MEILLEURES POUR UNE VIE MEILLEURE

OECD/OCDE 403

Adopteé :
09 septembre 2009
Corrigée : 25 juin 2024

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

Toxicité aiguë par inhalation

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences règlementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. Une première Ligne directrice 403 pour les essais de toxicité aiguë par inhalation a été adoptée en 1981. La présente Ligne directrice révisée (LD 403) (1) a été conçue afin d'offrir une plus grande souplesse, de réduire l'utilisation d'animaux et de répondre aux exigences règlementaires. Elle décrit deux types d'études : un protocole traditionnel de détermination de la CL_{50} et un protocole « concentration x temps » (C x t). Les principales caractéristiques de cette Ligne directrice tiennent au fait qu'elle permet d'obtenir une relation concentration-réponse pour les effets non létaux à létaux, afin d'en déduire une concentration létale médiane (CL_{50}), une concentration seuil non létale (comme la CL_{01}) et une pente, ainsi que de déterminer si un des sexes est plus sensible à l'article d'essai. Le protocole C x t est utilisé lorsque s'applique une réglementation particulière ou pour un besoin scientifique qui nécessite un essai sur des animaux pour plusieurs durées d'exposition différentes, par exemple à des fins d'aménagement du territoire ou de planification des interventions d'urgence: calcul des niveaux guides d'exposition aiguë, recommandations pour la planification des mesures d'urgence, niveaux seuil d'exposition aiguë, etc.

2. On trouvera dans le document d'orientation N° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (document d'orientation 39) des indications sur la conduite et l'interprétation des études liées à la LD 403 (2). La Ligne directrice 403 ne devrait être utilisée qu'en dernier recours après avoir étudié toutes les informations existantes (y compris les études *in vitro*, *in chemico*, *in silico*). Si un test *in vivo* est requis, il est préférable d'utiliser une méthode alternative utilisant moins d'animaux et des mesures d'effets plus raffinées (LD 433 et LD 436). Il y a des cas où la LD 403 peut malgré tout s'avérer nécessaire pour certaines autorités réglementaires. Il faut noter que les données générées dans des versions précédentes de cette Ligne directrice restent tout à fait valables.

3. Le document d'orientation 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de la présente Ligne directrice.

4. Cette Ligne directrice permet de caractériser les articles d'essai, de les soumettre à une évaluation quantitative les risques, et de les classer selon le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies (SGH) (3). Le document d'orientation 39 (2) fournit des indications pour le choix de la Ligne directrice appropriée pour les essais de toxicité aiguë. Lorsque seules des informations sur la classification et l'étiquetage sont requises, la Ligne directrice 436 (4) est généralement recommandée, cf. document d'orientation 39 (2). La Ligne directrice 403 pour les essais n'est pas spécifiquement destinée à tester des matériaux spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

© OCDE (2024)
L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site : http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à cette Ligne directrice, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur l'article d'essai, y compris les études existantes (LD 436, par exemple (4)) dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de l'article d'essai, les résultats de tous les essais de toxicité *in vitro* ou *in vivo* auxquels elle a été soumise, son(ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine, les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées, cf. document d'orientation 39 (2).

6. Il convient d'éviter autant que possible de tester des substances corrosives et/ou irritantes à des concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance sévère et/ou une détresse. Pour déterminer s'il est possible de renoncer à des essais complémentaires, le potentiel de corrosion/d'irritation fait l'objet d'une évaluation reposant sur un jugement d'expert basé sur les éléments suivants : données expérimentales sur l'homme et l'animal (provenant, par exemple, d'essais à doses répétées réalisés à des concentrations non corrosives ou irritantes), données *in vitro* existantes (par exemple LD 430 (5), LD 431 (6), ou LD 435 (7)) , valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente. À des fins règlementaires spécifiques (par exemple pour l'établissement de plans d'urgence), la LD 403 peut être utilisée pour exposer des animaux à ces substances car elle donne au directeur de l'étude ou à l'investigateur principal la maîtrise du choix des concentrations cibles. Celles-ci ne doivent cependant pas induire d'effets corrosifs/irritants importants, mais elles sont suffisantes pour prolonger la courbe de concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Ces concentrations sont choisies au cas par cas et une justification du choix des concentrations est apportée, cf. document d'orientation 39 (2).

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La présente Ligne directrice révisée LD 403 doit en principe permettre d'obtenir des informations suffisantes sur la toxicité aiguë d'un article d'essai pour procéder à son classement, et fournir les données sur sa létalité nécessaires aux évaluations quantitatives des risques (CL_{50}, CL_{01} et pente, par exemple) pour l'un des sexes ou les deux. Cette Ligne directrice propose deux méthodes d'essai. La première suit un protocole traditionnel dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration limite (essai limite) ou à une série de concentrations suivant un processus séquentiel pendant une durée prédéterminée de quatre heures en général. Des objectifs règlementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. La seconde méthode suit un protocole « concentration x temps » (C x t) dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration (concentration limite) ou à une série de concentrations différentes sur des durées différentes.

8. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Ils sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation N°19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (8).

© OCDE (2024)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces animales

9. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

10. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel n'excède pas, pour chaque sexe, ±20% du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

11. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3°C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés « nez seul », il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés « corps entier » à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. A l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

12. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de l'article d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition « nez seul » (qui inclut les dispositifs « tête seule », « nez seul » et « museau seul ») est privilégié. Le mode d'exposition « nez seul » est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition « corps entier » peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est alors justifié dans le rapport d'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition « corps entier », on veille à ce que le volume total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition « corps entier » ou « nez seul », ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

© OCDE (2024)

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

13. Les expositions « nez seul » peuvent durer jusqu'à 6 heures pour les rats. Pour les souris, les expositions « nez seul » ne dépassent pas 4 heures en général. Si des essais d'une durée plus longue sont nécessaires, une justification est apportée, cf. document d'orientation 39 (2). Les animaux exposés « corps entier » à des aérosols demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de l'article d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition « corps entier », les animaux peuvent boire de l'eau.

14. Les animaux sont exposés à l'article d'essai présenté sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

15. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 µm, avec un écart type géométrique (σg) compris entre 1.5 et 3.0 (2) (9) (10). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide de l'appareil respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de l'article d'essai dans un véhicule

16. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de l'article d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale, l'eau est choisie de préférence. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer l'article d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de l'article d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de l'article d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer l'article d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

17. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude d'un article

© OCDE (2024)

d'essai préparé dans un véhicule, celui-ci est considéré comme non toxique à la concentration testée ; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

18. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition « nez seul » lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant l'article d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (2) (11). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

19. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22±3°C. Dans les cas d'exposition « nez seul » et « corps entier » l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est surveillée et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour des durées plus courtes. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque l'article d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de l'article d'essai avec la méthode d'essai.

Article d'essai: Concentration nominale

20. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de l'article d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Article d'essai: Concentration réelle

21. La concentration réelle est la concentration de l'article d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à l'article d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer

© OCDE (2024)

nécessaire de soumettre le produit d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.

22. Un seul lot de l'article d'essai est utilisé, si possible, et l'échantillon est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de l'article d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes : temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de l'article d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

23. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible et suivie soit en continu, soit de façon intermittente suivant la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, on a recours à quatre échantillons par exposition pour les concentrations d'essai suivantes. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ±10 % pour les gaz et vapeurs ou ±20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de l'article d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95}. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

24. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisit donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la substance active principale dans la préparation du produit d'essai. Quand l'article d'essai est un mélange (une préparation, par exemple), la concentration analytique devra être indiquée pour la préparation totale et pas uniquement pour la substance active ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Article d'essai: Répartition granulométrique

25. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, cf. document d'orientation 39 (2). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au maximum les données douteuses qui

© OCDE (2024)

nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 15).

MODE OPERATOIRE

26. Les deux types d'études décrits ci-dessous sont le protocole traditionnel et le protocole C x t. Tous deux peuvent comprendre une étude préliminaire, une étude principale et/ou un essai limite (protocole traditionnel) ou un essai à une concentration limite (C x t). Si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à l'article d'essai, le directeur de l'étude peut choisir de réaliser ces essais avec seulement des animaux de ce sexe. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées « nez seul », il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Avant le début de l'étude, toutes les données disponibles sont examinées afin de réduire l'usage des animaux. Par exemple, les données obtenues à l'aide de la LD 436 (4) peuvent supprimer la nécessité d'une étude préliminaire et aussi démontrer si l'un des sexes est plus sensible à l'article d'essai, cf. document d'orientation 39 (2).

PROTOCOLE TRADITIONNEL

Considérations générales sur le protocole traditionnel

27. Dans une étude traditionnelle, des groupes d'animaux sont exposés à un article d'essai pendant une période de temps fixée (généralement 4 heures) dans une chambre d'exposition « nez seul » ou « corps entier ». Les animaux sont exposés soit à une concentration limite (essai limite), soit à trois concentrations au minimum selon une procédure séquentielle (étude principale). Une étude préliminaire peut précéder l'étude principale, sauf s'il existe déjà des informations concernant l'article d'essai, provenant par exemple d'une étude précédente effectuée selon la LD 436 (4), cf. document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole traditionnel

28. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de l'article d'essai, d'identifier des différences entre les sexes quant à la sensibilité à cette substance, et de choisir plus facilement les niveaux de concentration pour l'étude principale ou l'essai limite. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les données (Q)SAR et les données correspondant à des produits chimiques analogues. Pour chaque concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles (il peut être nécessaire d'utiliser 3 animaux par sexe pour établir une différence de sensibilité entre les sexes). Une étude préliminaire peut être effectuée avec une seule concentration, ou plusieurs si nécessaire. Elle ne porte pas sur un nombre d'animaux ou de concentrations tel qu'elle ressemblerait à une étude principale. Il est possible d'utiliser les résultats d'une étude LD 436 (4) précédente au lieu de réaliser une étude préliminaire, cf. document d'orientation 39 (2).

Essai limite pour le protocole traditionnel

29. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que l'article d'essai sera virtuellement non toxique, c.à.d. qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Dans un essai limite, un seul groupe de trois mâles et trois femelles est exposé à l'article d'essai à une concentration limite. Des informations sur la toxicité de l'article d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances, produits ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité

© OCDE (2024)

et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de l'article d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé.

30. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences règlementaires. Lorsqu'on utilise le système de classification SGH, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire d'un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, cf. document d'orientation 39 (2). Selon le SGH, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais aux concentrations limites ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

31. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration limite, les résultats de l'essai limite peuvent servir d'étude préliminaire pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de l'article d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui devra être testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire l'article d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole traditionnel

32. Une étude principale fait en général appel à cinq mâles et cinq femelles (ou cinq animaux du sexe le plus sensible, s'il est connu) par niveau de concentration, avec au minimum trois niveaux de concentration. Les niveaux de concentration sont suffisamment nombreux pour que l'on puisse obtenir une analyse statistique fiable. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible pour le groupe suivant. Pour les essais de toxicité par inhalation, qui nécessitent des technologies sophistiquées, il ne sera pas toujours possible de procéder ainsi, c'est pourquoi l'exposition des animaux à la concentration supérieure devra se baser sur l'expérience acquise et un jugement scientifique. Pour les essais portant sur des mélanges, il convient de se référer au document d'orientation 39 (2).

© OCDE (2024)

PROTOCOLE « CONCENTRATION X TEMPS » (C x t)

Considérations générales sur le protocole C x t

33. Une étude séquentielle « concentration x temps » (C x t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Avec cette approche, les animaux sont exposés à l'article d'essai à plusieurs niveaux de concentration et pour des durées d'exposition variables. Tous les essais sont réalisés dans des chambres d'exposition « nez seul », les chambres « corps entier » ne se prêtant pas à ce protocole. Un exemple de procédure séquentielle illustrant ce protocole est présenté à l'annexe 1. Une analyse de simulation a montré que le protocole traditionnel et le protocole C x t étaient tous les deux capables de donner des valeurs fiables de la CL_{50}, mais que le protocole C x t permettait en général d'obtenir des valeurs plus sûres pour la CL_{01} et la CL_{10} (15).

34. Une analyse de simulation a démontré qu'il convient généralement d'utiliser deux animaux par intervalle de C x t (un animal de chaque sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible) pour tester 4 concentrations et 5 durées d'exposition lors de l'étude principale. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser deux rats de chaque sexe par intervalle de C x t (15), de manière à réduire le biais et la variabilité des estimations, augmenter le taux de succès de l'estimation et améliorer la couverture de l'intervalle de confiance. Cependant, en cas d'ajustement insuffisant aux données (en utilisant un animal par sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible), une cinquième concentration d'exposition peut également suffire. Pour plus d'informations sur le nombre d'animaux et les concentrations à utiliser pour une étude C x t, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole C x t

35. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de l'article d'essai et facilite le choix des niveaux de concentration pour l'étude principale. Une étude préliminaire avec au maximum trois animaux par sexe et par concentration (pour plus de détails, voir l'appendice III du document d'orientation 39) (2) peut être utilisée afin de sélectionner une concentration de départ appropriée pour l'étude principale et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Il peut en effet être nécessaire de recourir à trois animaux par sexe pour établir une différence selon le sexe. Ces animaux sont soumis à une exposition unique, d'une durée de 240 minutes en général. Pour évaluer la faisabilité de la production d'atmosphères d'essai appropriées, des essais techniques préliminaires sans animaux sont réalisés. Il n'est généralement pas nécessaire de procéder à une étude préliminaire si l'on dispose de données de mortalité provenant d'une étude effectuée suivant la LD 436 (4). Pour choisir la concentration cible initiale dans une étude LD 403, le directeur de l'étude tient compte des profils de mortalité observés dans n'importe quelle étude LD 436 (4) disponible, pour les deux sexes et pour toutes les concentrations testées, cf. document d'orientation 39 (2).

Concentration initiale pour le protocole C x t

36. La concentration initiale (Session d'exposition I) (voir annexe 1) est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Des groupes constitués d'un animal de chaque sexe sont exposés à cette concentration pendant des périodes de durée variable (15, 30, 60, 120 ou 240 minutes, par exemple), soit un total de 10 animaux, pour ce qu'on appelle la Session d'exposition I (voir annexe 1).

© OCDE (2024)

37. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences règlementaires. Lorsqu'on utilise le système de classification SGH, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, l'objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, cf. document d'orientation 39 (2). Selon le SGH, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais au-delà de la concentration limite ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est alors fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai à la concentration initiale pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai à cette concentration.

38. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration initiale, les résultats obtenus à cette concentration peuvent servir de point de départ pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de l'article d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui est testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire l'article d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole C x t

39. La concentration initiale (Session d'exposition I) (voir annexe 1) testée dans l'étude principale est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Si une mortalité a été observée pendant ou après la Session I, l'exposition minimale (C x t) qui a provoqué la mortalité sert de guide pour déterminer la concentration et les périodes d'exposition pour la Session II. Chaque session d'exposition suivante dépendra de la session précédente (voir annexe 1).

40. Pour de nombreuses substances d'essai, les résultats obtenus à la concentration initiale, plus ceux obtenus lors de trois sessions d'exposition supplémentaires sur une échelle de temps plus courte (la durée des périodes d'exposition successives suivant une progression géométrique de facteur $\sqrt{2}$), sont suffisants pour établir la relation de mortalité C x t (16). Nonobstant, il peut être utile de recourir à une cinquième concentration d'exposition [voir annexe 1 et document d'orientation 39 (2)]. Pour le traitement mathématique des résultats concernant le protocole C x t, voir annexe 1.

OBSERVATIONS

41. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la

© OCDE (2024)

suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec une toxicité de l'article d'essai qui impliquerait d'euthanasier les animaux plus tôt. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération, cf. document d'orientation 19 (8). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

42. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différentiation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

43 Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci et au moins les jours 1, 3, et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite), ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveille donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 %, ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période post-exposition.

Pathologie

44. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

45. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Peuvent aussi être examinés les organes montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures, et ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

© OCDE (2024)

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

46. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai : le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants :

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, y compris : nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.
- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat.
- Nombre, âge et sexe des animaux.
- Méthode de randomisation.
- Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).
- Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Article d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).
- Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

- Description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume.
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.

© OCDE (2024)

- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.
- Source de l'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.
- Différence de pression (positive ou négative).
- Orifices d'exposition par chambre (« nez seul ») ou emplacement des animaux dans la chambre (« corps entier »).
- Homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai.
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.
- Débits d'air, débit d'air par orifice d'exposition (« nez seul ») ou rapport du volume de l'animal à la chambre (« corps entier »).
- Informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone.
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t95).
- Nombre de changements de volume par heure.
- Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

- Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.
- Concentrations nominales (masse totale de l'article d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).
- Concentrations réelles de l'article d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux ; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.
- Toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m3, etc.) ; les unités de volume (ppm, ppb, etc.) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses.
- Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σg), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

- Détails sur la préparation de l'article d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de l'article d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de l'article d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de l'article d'essai.
- Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.
- Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de l'article d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).
- Justification du choix des concentrations d'essai.

© OCDE (2024)

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σg.
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).
- Poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue ; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité.
- Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.
- Estimations de la létalité (CL50, DL01 par exemple), notamment limites de confiance à 95 % et pente (si elle est fournie par la méthode d'évaluation).
- Relation statistique, y compris l'estimation du facteur n (pour le protocole C x t). Le nom du logiciel de statistiques utilisé est renseigné.

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente Ligne directrice, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.
- La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (8).
- Si un essai suivant la LD 436 (4) a dû être interrompu en faveur de la LD 403, les justifications sont fournies.
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

© OCDE (2024)

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2009), Ligne directrice 403. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Toxicité aiguë par inhalation, OCDE, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. OCDE (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et évaluations n°39, OECD, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3. Nations Unies (NU) (2007). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), ST/SG/AC.10/30, ONU New York et Genève. Disponible [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_f.htm]

4. OCDE (2009), Ligne directrice 436. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë (ATC), OCDE, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

5. OCDE (2004), Ligne directrice 430. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Corrosion cutanée in vitro : Essai de résistance électrique transcutanée (RET), OCDE, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

6. OCDE (2004), Ligne directrice 431. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Corrosion cutanée *in vitro* : Essai sur modèle de peau humaine, OCDE, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OCDE (2005), Ligne directrice 435. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée, OCDE, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. 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 n°19, OCDE, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol*. 18, 321-327.

10. Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2ème édition) Informa Healthcare, New York.

11. Pauluhn, J. et Thiel, A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol*. 27, 160-167.

12. Zwart, J.H.E., Arts, J.M., ten Berge, W.F. et L.M. Appelman. (1992), Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol*. 15, 278-290.

© OCDE (2024)

13. Zwart, J.H.E., Arts, J.M., Klokman-Houweling, E.D. et Schoen, E.D. (1990), Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol*. 2. 105-117.

14. W.F. ten Berge, A.Zwart. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat*. 21, 65-71.

15. OCDE (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et évaluations n°39, OECD, Paris. Disponible [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16. Finney D.J. (1977), Probit Analysis, 3ème édition. Cambridge University Press, Londres/New York.

© OCDE (2024)

ANNEXE 1

PROTOCOLE C x t

1. Une étude séquentielle « Concentration x Temps » (C x t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Elle est privilégiée lorsqu'une réglementation particulière s'applique ou pour un besoin scientifique nécessitant des essais sur animaux portant sur des durées d'exposition multiples, par exemple à des fins d'établissement de plans d'intervention d'urgence ou d'aménagement du territoire. Cette approche débute en général avec un essai à la concentration limite (Session d'exposition I) au cours duquel les animaux sont exposés à l'article d'essai pendant cinq périodes de durées différentes (15, 30, 60, 120 et 240 minutes par exemple) de façon à obtenir plusieurs durées d'exposition pour une même séance (voir figure 1). Lorsqu'on utilise le système de classification SGH, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Ces niveaux ne peuvent être dépassés que s'il est indispensable de réaliser des essais à ces niveaux de concentration pour des raisons règlementaires ou scientifiques (voir le paragraphe 37 du texte de la LD 403).

2. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de l'article d'essai, une étude préliminaire peut être réalisée, au cours de laquelle des groupes d'au maximum 3 animaux par sexe sont exposés à des concentrations cibles sélectionnées par le directeur de l'étude, en général sur une durée de 240 minutes.

3. Si une concentration limite est testée lors de la Session d'exposition I et que l'on observe une mortalité inférieure à 50 %, il n'est pas nécessaire d'effectuer des essais supplémentaires. Si, pour des raisons règlementaires ou scientifiques, il est indispensable d'établir la relation concentration/ temps/réponse pour des niveaux plus élevés que la concentration limite indiquée, l'exposition suivante est réalisée, par exemple, au double de la concentration limite (c'est-à-dire 2L dans la figure 1).

4. Si une toxicité est observée à la concentration limite, des essais supplémentaires (étude principale) sont nécessaires. Ces expositions supplémentaires sont réalisées soit à des concentrations plus faibles (dans la figure 1 : Sessions d'exposition II, III ou IV), soit à des concentrations plus fortes sur des durées plus courtes (dans la figure 1, Session d'exposition IV) qui sont adaptées et moins espacées.

5. L'essai (concentration initiale et concentrations supplémentaires) est réalisé avec 1 animal de chaque sexe par point concentration/temps, ou avec 2 animaux du sexe le plus sensible à l'article d'essai par point concentration/temps. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser 2 rats de chaque sexe par point concentration/temps, ou 4 animaux du sexe le plus sensible à l'article d'essai par point concentration/temps (15). L'utilisation de 2 animaux par point concentration/temps réduit en général le biais et la variabilité des estimations, augmente le taux de succès de l'estimation et améliore la couverture de l'intervalle de confiance lié à ce protocole. Pour plus de détails, se reporter au DOCUMENT D'ORIENTATION39 (2).

6. Idéalement, chaque session d'exposition est exécutée sur une seule journée, ce qui donne la possibilité de retarder l'exposition suivante jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr de la survie des animaux, et permet au directeur de l'étude d'ajuster la concentration cible et les durées pour la prochaine séance d'exposition. Il est recommandé de commencer chaque séance d'exposition avec le groupe qui sera exposé le plus longtemps, 240 minutes par exemple, suivi du groupe qui sera exposé 120 minutes, et ainsi de suite. Si, par exemple, les animaux du groupe exposé 240 minutes meurent après 90 minutes d'exposition ou montrent des signes importants de toxicité (par exemple, modifications considérables de

© OCDE (2024)

la respiration, notamment difficultés respiratoires), il est inutile d'exposer un groupe pendant 120 minutes car la mortalité serait très vraisemblablement de 100 %. Le directeur de l'étude choisit alors des durées d'exposition plus courtes pour cette concentration (90, 65, 45, 33 et 25 minutes par exemple).

7. La concentration dans la chambre d'exposition est mesurée régulièrement pour déterminer la concentration moyenne pondérée en fonction du temps pour chaque durée d'exposition. Autant que possible, c'est l'heure de la mort de chaque animal qui est utilisée dans l'analyse statistique (et non la durée d'exposition).

8. Il convient d'examiner les résultats des quatre premières sessions d'exposition pour repérer les éventuelles données manquantes dans la courbe concentration-temps (voir figure 1). S'il manque effectivement des données, une exposition supplémentaire (5ème concentration) peut être réalisée. La concentration et les durées d'exposition de cette 5ème exposition sont choisies de manière à combler cette lacune.

9. Toutes les sessions d'exposition (y compris la première) seront utilisées pour calculer la relation concentration-temps-réponse au moyen d'une analyse statistique (16). On utilisera si possible, pour chaque intervalle C x t, la concentration moyenne pondérée en fonction du temps et la durée d'exposition jusqu'à la mort (si celle-ci intervient durant l'exposition).

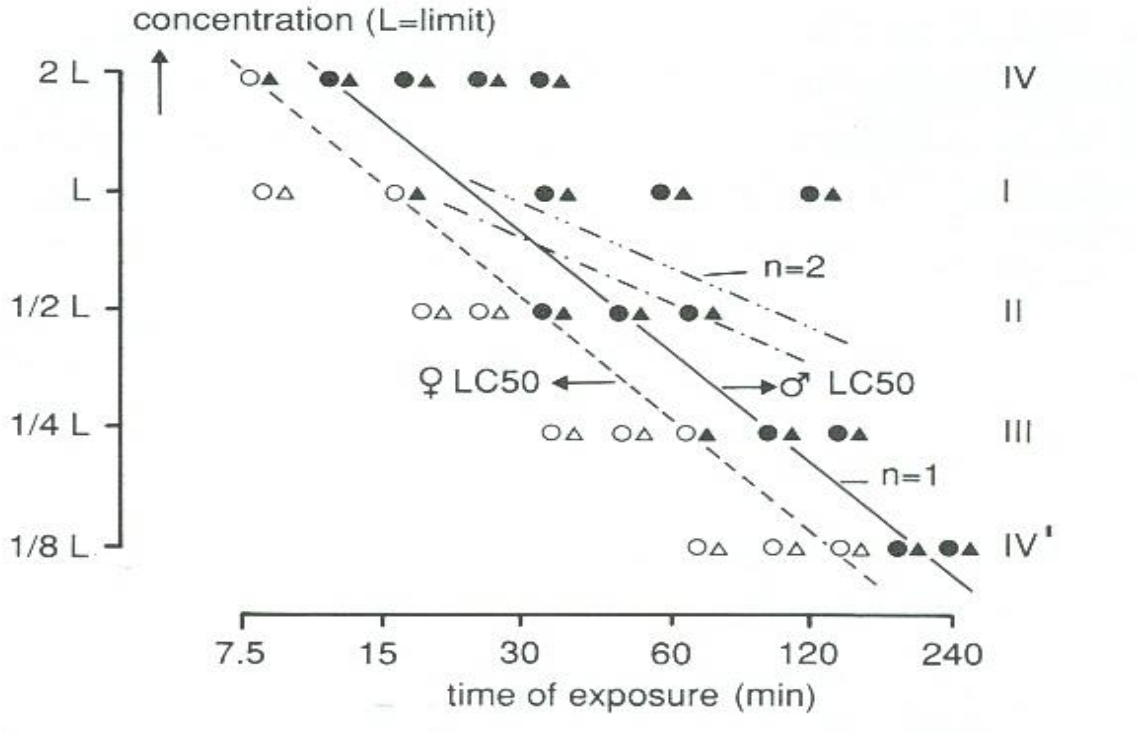


Figure 1 : Illustration hypothétique d'une relation concentration-temps-mortalité chez des rats.

Symboles vides = animaux survivants, symboles pleins = animaux morts
Triangles = femelles, cercles = mâles
Ligne pleine = valeurs de CL_{50} (de 7.5 à 240 minutes) pour les mâles, n=1
Ligne tiretée = valeurs de CL_{50} (de 7.5 à 240 minutes) pour les femelles, n=1
Lignes pointillées = valeurs de la CL_{50} hypothétique pour les mâles et les femelles si n avait

© OCDE (2024)

été égal à 2 (12).

10. On trouvera ci-dessous un exemple de la procédure séquentielle:

Session d'exposition I – Essai à la concentration limite (voir figure 1)

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total[a]
- Concentration cible[b] = concentration limite
- Exposer cinq groupes d'animaux à cette concentration cible pendant respectivement 15, 30, 60, 120 et 240 minutes

↓

Session d'exposition II[c] – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible[d] (1/2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓

Session d'exposition III – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible[d] (1/4L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓

Session d'exposition IV′ – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible[d] (1/8L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓ ou

Session d'exposition IV – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus forte[e] (2L) pendant des durées légèrement plus courtes (d'un facteur √2, voir figure 1).

[a] Si aucune information n'est disponible sur la sensibilité de chaque sexe à l'article d'essai, des rats des deux sexes seront utilisés, soit 1 animal de chaque sexe par concentration. A partir d'informations existantes ou s'il apparaît au cours de cette session d'exposition qu'un des sexes est plus sensible, 10 animaux de ce sexe seront utilisés (2 animaux par point concentration/temps) à chaque niveau de concentration pour les essais suivants.

[b] Lorsqu'on utilise le système de classification SGH, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Si l'on s'attend à une toxicité ou en raison des résultats de l'étude préliminaire, on choisit des concentrations de départ plus faibles. Pour des besoins règlementaires

© OCDE (2024)

ou scientifiques, des concentrations plus fortes peuvent être utilisées.

[c] Idéalement, l'exposition des animaux au niveau de concentration suivant est retardée jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible et les durées pour la session d'exposition suivante.

[d] La dose minimale (concentration x temps) qui provoque la mortalité au cours de l'essai à la concentration initiale (première session d'exposition) servira de guide pour déterminer la prochaine combinaison de concentrations et de durées d'exposition. Généralement, la concentration diminuera de moitié (1/2L) et les animaux seront exposés sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1.4 (√2 ; voir référence 12) centrée sur le temps correspondant au niveau de la dose létale minimale (temps x concentration) observé lors de la première exposition. Dans la figure 1, la mortalité au cours de la Session d'exposition I a d'abord été observée au bout de 15 minutes ; les durées de la Session II ont donc été centrées autour de 30 minutes et sont de 15, 21, 30, 42 et 60 minutes. Après les deux premières expositions, il est fortement recommandé de tracer les résultats dans un graphique similaire, comme indiqué ci-dessus, et de vérifier si la relation entre la concentration et le temps définit un angle de 45 degrés (n=1) ou si la pente de la relation concentration-temps-réponse est moins forte (n=2 par exemple) ou plus forte (n=0.8 par exemple). Dans ces derniers cas, il est fortement recommandé d'adapter en conséquence les concentrations et les durées suivantes.

[e] Dans certains cas, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration (2L) sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1.4 (√2) centrée sur le temps correspondant au niveau de dose létale minimale observé lors de la première exposition. La durée minimale d'exposition est de préférence supérieure à 5 minutes et la durée maximale d'exposition ne dépasse pas 8 heures.

Traitement mathématique des résultats pour le protocole C x t

11. Une procédure C x t constituée de 4 ou 5 concentrations d'exposition et de 5 durées d'exposition génère respectivement 20 ou 25 points de données. Avec ces points de données, la relation C x t peut être calculée à l'aide d'une analyse statistique (16):

$$Probit\ (P) = b_0 + b_1\ ln\ C + b_2\ ln\ t \qquad \text{Equation 1}$$

où C = concentration; t = durée d'exposition, ou

$$Réponse = f(C^n t) \qquad \text{Equation 2}$$

où $n = b_1 / b_2$.

Avec l'équation 1, la valeur de la CL_{50} peut être calculée pour une période de temps donnée (par exemple, 4 heures, 1 heure, 30 minutes ou n'importe quelle période de temps comprise dans la plage des périodes de temps testées) avec P = 5 (50 % de réponse). A noter que la règle de Haber ne s'applique que lorsque n = 1. La CL_{01} est calculée avec P = 2.67.

© OCDE (2024)