Section 4
Effets sur la santé

Essai n° 421:
Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement



25 juin 2025

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

OCDE
DES POLITIQUES MEILLEURES POUR UNE VIE MEILLEURE

OECD/OCDE 421

Adoptée :
25 juin 2025
Corrigée :
18 septembre 2025
réf : OCDE (2025)

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

ESSAI DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La Ligne directrice 421, Ligne directrice de dépistage, a été initialement adoptée en 1995, sur la base d'un protocole pour un « essai préliminaire de dépistage de la toxicité pour la reproduction », discuté lors de deux réunions d'experts, à Londres en 1990 (1) et à Tokyo en 1992 (2).

2. La présente Ligne directrice a été mise à jour en y introduisant des paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens, suite à une activité prioritaire lancée par l'OCDE en 1998, destinée à réviser les Lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (3). La Ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs), par exemple, a été mise à jour en 2008 en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des produits chimiques d'essai. L'objectif de la mise à jour de la Ligne directrice 421 était d'inclure des paramètres pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens dans des Lignes directrices de dépistage au cours desquelles les périodes d'exposition couvrent certaines périodes sensibles du développement (périodes prénatale ou suivant la naissance).

3. Les paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens qui ont été sélectionnés et ajoutés, font aussi partie de la Ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération) ; ils ont été introduits dans la Ligne directrice 421 sur la base d'une étude de faisabilité étudiant les questions scientifiques et techniques liées à l'inclusion de ces paramètres, ainsi que les ajustements possibles à mettre en œuvre dans la conception de l'essai pour permettre leur inclusion (4).

4. La présente ligne directrice vise l'obtention d'informations sommaires concernant les effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Elle ne vient pas en remplacement des Lignes directrices existantes 414, 415, 416 ou 443.

© OCDE (2025)

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

CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

5. La présente ligne directrice peut être appliquée en vue d'obtenir une première série d'informations concernant les effets possibles d'un produit chimique sur la reproduction et/ou sur le développement, soit au stade initial d'une évaluation toxicologique soit dans l'évaluation d'un produit chimique particulièrement préoccupant. Elle peut avoir son utilité dans un ensemble d'essais de tri initial de produits chimiques existants pour lesquels les informations toxicologiques sont peu nombreuses ou absentes et peut donner des indications sur l'éventail de doses à utiliser dans des études plus complètes des effets sur la reproduction ou le développement. L'utilisation de cette ligne directrice peut être justifiée dans d'autres cas. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le Document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (5).

6. Cet essai ne permet pas d'obtenir des informations complètes sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, il n'offre qu'un moyen partiel de détecter des manifestations post-natales liées à des expositions prénatales ou des effets éventuellement liés à une exposition post-natale. Étant donné (entre autres raisons) le nombre relativement faible d'animaux dans les groupes, la sélection des effets observés retenue et la brièveté de l'étude, cette méthode ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. De plus, en l'absence de données tirées d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité de procéder à d'autres essais et de définir le calendrier de ceux-ci.

7. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien » (6). La Ligne directrice 421 mise à jour fait partie du niveau 4 de ce Cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets adverses affectant les paramètres endocriniens pertinents. Un signal endocrinien ne sera néanmoins pas toujours considéré comme une preuve suffisante en tant que telle que le produit chimique d'essai est un perturbateur endocrinien.

8. La présente Ligne directrice a été mise à jour en 2025 pour permettre de façon optionnelle de collecter des échantillons de tissus et les cryopréserver en vue d'investigations complémentaires. La décision d'inclure des mesures optionnelles permises dans cette Ligne directrice doit refléter l'état des connaissances existantes sur le produit chimique testé ou des produits chimiques similaires, ainsi que les besoins réglementaires des différentes autorités.

9. Dans la présente ligne directrice, l'administration du produit chimique d'essai est supposée être par voie orale. Des modifications peuvent s'avérer indispensables si d'autres voies d'administration sont retenues.

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

11. Les définitions employées figurent en annexe 1.

© OCDE (2025)

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Le produit chimique d'essai est administré à des doses graduées à plusieurs groupes de mâles et de femelles. Les mâles doivent recevoir le produit chimique pendant un minimum de quatre semaines y compris le jour précédant le sacrifice, soit un minimum de deux semaines avant l'accouplement, pendant la période d'accouplement et environ deux semaines après l'accouplement. Compte tenu de la période limitée d'administration chez les mâles avant l'accouplement, la fertilité n'est pas nécessairement un indicateur précis de la toxicité testiculaire. Il faut donc procéder à un examen histologique détaillé des testicules. Compte tenu de la période d'administration de deux semaines préalable à l'accouplement, suivie d'observations concernant l'accouplement et la fertilité, et du fait que le produit chimique d'essai est administrée au total pendant au moins quatre semaines suivies par un examen histopathologique détaillé des gonades mâles, on juge que les conditions sont suffisantes pour permettre de détecter la plupart des effets sur la fertilité mâle et la spermatogénèse.

13. Le produit chimique d'essai doit être administré aux femelles tout au long de l'étude. Celle-ci couvre deux semaines préalables à l'accouplement (de manière à englober au moins deux cycles œstraux complets), la durée variable qui précède la conception, la période de gestation et au moins treize jours après la parturition, y compris le jour précédant celui prévu pour le sacrifice.

14. La durée de l'étude, après acclimatation et évaluation du cycle œstral préalable au traitement, dépend du comportement de la femelle et s'étend sur environ 63 jours (14 jours avant l'accouplement, un maximum de 14 jours pour l'accouplement, 22 jours de gestation, 13 jours de lactation).

15. Pendant la période d'administration, les animaux font l'objet d'une observation quotidienne rigoureuse visant à détecter les signes de toxicité. Les animaux qui périssent ou sont sacrifiés au cours de l'essai sont soumis à une autopsie ; à la fin de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces

16. La présente Ligne directrice vise les essais sur le rat. Si les paramètres spécifiés dans la présente Ligne directrice 421 sont examinés chez une autre espèce de rongeur, une justification détaillée sera donnée. Dans le programme international de validation pour la détection des perturbateurs endocriniens pour la Ligne directrice 407, le rat était la seule espèce utilisée. Les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement sont à éviter. Il convient d'employer des animaux vierges et sains, sur lesquels aucune expérience n'a été précédemment réalisée. Les animaux soumis à l'essai doivent être caractérisés comme suit : espèce, souche, sexe, poids et âge. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder ± 20 % de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou une étude portant sur une génération complète, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

17. Toutes les procédures se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection des animaux de laboratoire. La température de l'animalerie doit être de 22°C (+ 3°C). Idéalement l'humidité relative devrait être comprise entre 50 et 60 %. Elle devrait être au moins égale à 30 % et ne pas dépasser 70 %, sauf lors des opérations de nettoyage du local. Un éclairage artificiel doit être dispensé pour obtenir une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la

© OCDE (2025)

nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture.

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

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

Préparation des animaux

20. De jeunes adultes sains sont répartis au hasard entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de façon à minimiser les effets possibles dus à leur agencement. Les animaux sont marqués individuellement à des fins d'identification et maintenus dans leurs cages pendant cinq jours au moins avant le démarrage de l'étude afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

21. Il est recommandé d'administrer le produit chimique d'essai par voie orale sauf si d'autres voies sont jugées plus indiquées. Lorsque l'administration par voie orale est retenue, le produit chimique d'essai est généralement administré par gavage; toutefois, il peut aussi être administré par le biais des aliments ou de l'eau de boisson.

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

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

23. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 males et 12-13 femelles. Avant le début de l'exposition, on évaluera les cycles œstraux chez les femelles et les animaux que ne présentent pas un cycle classique de 4-5 jours ne seront pas inclus dans l'étude ; c'est pourquoi on recommande l'utilisation de femelles supplémentaires, pour parvenir à 10 femelles par groupe. Sauf dans le cas d'effets toxiques marqués, on devrait obtenir au moins 8 femelles gravides par groupe, soit le nombre minimum généralement acceptable. Il s'agit d'aboutir à un nombre suffisant de gestations et à une progéniture suffisamment abondante pour permettre une évaluation fiable de l'action du produit chimique d'essai sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et l'allaitement, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1 à partir de la conception jusqu'au 13ème jour après la parturition.

© OCDE (2025)

Détermination des doses

24. En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes de traitement et d'un groupe témoin. Les niveaux des doses peuvent être déterminés en fonction d'informations tirées d'essais de toxicité aiguë ou de résultats d'études portant sur l'administration de doses répétées. Exception faite de l'administration du produit chimique d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes soumis à l'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, le groupe témoin doit en recevoir le volume administré le plus élevé.

25. La détermination des niveaux des doses doit prendre en compte toutes les données sur la toxicité et les caractéristiques (toxico-)cinétiques disponibles. Il faut aussi prendre en compte le fait que les femelles gestantes et non-gestantes peuvent présenter des sensibilités différentes. La dose la plus élevée doit être choisie de façon à provoquer des effets toxiques mais sans provoquer la mort ou d'importantes souffrances. Ensuite, il convient de déterminer les doses par ordre décroissant pour mettre en évidence toute relation entre traitement et réponse et, au niveau de la dose la plus faible, l'absence d'effets nocifs observés (CSENO). On considère généralement optimal de définir des intervalles d'un facteur deux à quatre, l'intégration d'un quatrième groupe étant souvent jugé préférable à l'utilisation d'intervalles trop importants (supérieurs à un facteur de 10) entre les niveaux des doses.

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

Épreuve limite

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

Administration des doses

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

© OCDE (2025)

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

Calendrier de l'essai

30. L'administration du produit chimique d'essai aux animaux des deux sexes doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement, après une période d'acclimatation d'au moins cinq jours et après avoir observé que les femelles présentaient un cycle œstral normal (au cours d'une période prétraitement de 2 semaines). L'étude doit être programmée de telle sorte que l'accouplement débute peu après que les animaux ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Celle-ci intervient à des âges qui varient légèrement selon les espèces et selon les laboratoires, à savoir 10 semaines pour les rats Sprague Dawley et 12 semaines environ pour les rats Wistar. Les femelles ayant mis bas doivent être sacrifiées le 13ème jour qui suit la parturition ou peu après. Le jour de la naissance (où la parturition est achevée) marque le jour 0 de la période post partum. Les femelles qui ne montrent aucun signe de copulation sont sacrifiées 24 à 26 jours après le dernier jour de la période d'accouplement. L'administration du produit chimique d'essai aux mâles et aux femelles se poursuit durant la période d'accouplement. Au-delà, elle doit continuer pour les mâles, au moins jusqu'à la fin de la période totale d'administration, soit un minimum de 28 jours. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou bien maintenus en vie et continuent alors à recevoir le produit chimique d'essai en vue, le cas échéant, d'un second accouplement.

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

32. On trouvera une représentation schématique du calendrier d'essai en annexe 2.

Modalités d'accouplement

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

Taille des portées

34. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de quatre ou

© OCDE (2025)

cinq petits par sexe par portée, en fonction de la taille normale d'une portée dans la souche de rats utilisée. Des échantillons de sang seront prélevés sur deux des animaux surnuméraires, mis en commun, et utilisés pour la détermination des niveaux sériques de T4. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel ou la distance ano-génitale (DAG). Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre ou cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles). Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée. S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer le niveau sérique de T4.

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

Observations *In vivo*

Observations cliniques

36. Tout au long de la période d'essai, chaque animal doit être soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour, et plus fréquemment lorsque des signes de toxicité sont observés. Il est préférable de faire ces observations au(x) même(s) moment(s) de la journée en tenant compte des périodes culminantes au cours desquelles les effets attendus se manifestent après administration du produit chimique d'essai. Les changements de comportement dignes d'intérêt, ainsi que les signes de parturition difficile ou prolongée, de même que tous les signes de toxicité, mortalité comprise, doivent être consignés. Il convient de préciser le moment de déclenchement, le degré et la durée des signes de toxicité.

Poids corporel et consommation d'aliments et d'eau

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

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

Cycle œstral

39. Les cycles œstraux sont contrôlés avant le début du traitement pour sélectionner pour l'étude des femelles présentant un cycle régulier (voir paragraphe 22). Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour

© OCDE (2025)

depuis le début du traitement jusqu'à la confirmation de l'accouplement. Si l'on suspecte que des effets liés à un stress aigu lors de l'initiation du traitement pourraient perturber le cycle œstral, les laboratoires peuvent exposer les animaux de l'essai pendant deux semaines, puis effectuer des frottis vaginaux chaque jour pour contrôler le cycle œstral pendant un minimum de deux semaines débutant au début de la période de pré-accouplement et se poursuivant durant la période d'accouplement, jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (7) (8).

Caractéristiques de la descendance

40. La durée de la gestation doit être notée et calculée à partir du jour 0. Il importe d'examiner chaque portée dès que possible après la parturition de manière à déterminer le nombre et le sexe des petits, le nombre de morts-nés, de petits vivants et d'avortons (petits de taille sensiblement inférieure à celle des etits témoins), ainsi que les anomalies évidentes.

41. Dans les 24 heures qui suivent la parturition (jours 0 ou 1 post partum) et au moins aux jours 4 et 13 post partum, il faut compter les petits vivants et déterminer leur sexe et également peser les portées. En plus des observations (décrites au paragraphe 35), il faut consigner tout comportement anormal de la descendance.

42. On mesure la DAG de chaque petit au même jour suivant la naissance, entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG ; la DAG est rapportée à une mesure de la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (9). On devra compter le nombre de mamelons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13, comme le document d'orientation 151 de l'OCDE le recommande (10).

Biochimie clinique

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

- chez au moins deux petits par portée au jour 4 après la naissance, si le nombre de petits le permet (voir paragraphes 40-41);

- chez toutes les mères et chez au moins deux petits par portée à la fin de l'expérience au jour 13, et

- chez les adultes mâles à la fin de l'expérience.

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

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

- le moment du sacrifice, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales,

- la méthode de sacrifice, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes

© OCDE (2025)

- les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.

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

Pathologie

Autopsie générale

46. Lors du sacrifice ou en cas de mort survenue au cours de l'étude, les animaux adultes doivent faire l'objet d'un examen macroscopique visant à mettre en évidence d'éventuelles anomalies ou modifications pathologiques. On s'intéressera plus particulièrement aux organes de l'appareil reproducteur. Le nombre de sites d'implantation d'embryons doit être consigné. Les frottis vaginaux sont examinés le matin du jour de la nécropsie pour déterminer quelle est la phase du cycle œstral et permettre une corrélation avec l'histopathologie des ovaires.

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

48. Les petits morts ainsi que ceux qui sont sacrifiés au 13ème jour post partum, ou peu après, doivent être au moins soumis à un examen externe rigoureux visant à déterminer d'éventuelles anomalies flagrantes. Une attention particulière devra être apportée aux organes génitaux reproducteurs externes, pour lesquels on recherchera des signes de modification de leur développement. Le 13ème jour, il faudra conserver la thyroïde d'un petit mâle et d'un petit femelle par portée.

49. Les ovaires, testicules, organes sexuels secondaires (utérus et glaire cervicale, épididymes, prostate, vésicule séminale plus glande coagulantes), thyroïde, ainsi que l'ensemble des organes présentant des lésions macroscopiques de tous les animaux adultes doivent être conservés. La fixation à la formaline n'est pas recommandée pour l'examen de routine des testicules et épididymes. L'emploi du fixateur de Bouin ou du liquide de Davidson modifié est acceptable pour ces tissus (11). La tunique albuginée peut être perforée en douceur et de façon superficielle aux deux pôles de l'organe avec une aiguille permettant une pénétration rapide du liquide de fixation.

Histopathologie

50. Il convient de procéder à un examen histologique précis des ovaires, testicules et épididymes (en accordant une attention particulière aux étapes de la spermatogénèse et à l'histopathologie de la structure des cellules interstitielles des testicules) chez les animaux du groupe ayant reçu les doses les plus élevées et ceux du groupe témoin. Les autres organes conservés, incluant la thyroïde des petits et des animaux adultes, peuvent être examinés s'il y a lieu. Le poids de la thyroïde peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la

© OCDE (2025)

fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie. L'examen doit s'étendre aux animaux des groupes ayant reçu des doses différentes lorsque des modifications sont observées dans le groupe auquel ont été administrées les doses les plus élevées. Le document d'orientation sur l'histopathologie (11) donne plus de détails sur la dissection, la fixation, la section et l'histopathologie des tissues endocriniens.

Cryopréservation des échantillons

51. Le plasma en excès, ainsi que les tissus ou portion de tissus non utilisés pour l'histopathologie peuvent être préservés pour des investigations complémentaires telles que les explorations « omiques ». Les procédures recommandées pour la préservation sont disponibles dans le Document Guide No. 409 de l'OCDE (12).

52. On prendra soin de veiller à ce que la préservation d'échantillons supplémentaires ne compromette pas les paramètres standard mesurés.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

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

54. Compte tenu de la portée restreinte de l'étude, l'analyse statistique visant à vérifier le caractère significatif des résultats n'a qu'une valeur limitée pour de nombreux effets observés, notamment les effets sur la reproduction. Si une analyse statistique est réalisée, la méthode retenue doit convenir à la distribution de la variable examinée et doit être arrêtée préalablement à la mise en route de l'étude. S'il y a lieu, l'unité d'analyse sera la portée. L'analyse statistique de la DAG et de persistance du mamelon doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte les effets sur la portée. L'analyse statistique du poids corporel des petits doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte la taille de la portée. Étant donné la petite taille des groupes, il peut être utile de se référer à d'éventuelles données obtenues dans des études antérieures (taille des portées, par exemple) pour faciliter l'interprétation de l'étude.

Évaluation des résultats

55. Les résultats de cette étude sur la toxicité doivent être évalués en fonction des effets observés, de l'autopsie et des données microscopiques. L'évaluation portera notamment sur le lien entre, d'une part, la dose du produit chimique d'essai et, d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des

© OCDE (2025)

anomalies, y compris les lésions grossières, les organes cibles désignés, l'infertilité, les anomalies cliniques, l'action sur la reproduction et les portées, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.

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

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

Rapport

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

Produit chimique d'essai :

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

Substance mono-constituant :

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

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :

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

Véhicule (s'il y a lieu) :

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

Animaux soumis à l'essai :

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

Conditions de l'essai :

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

© OCDE (2025)

- indiquer si oui ou non une composante de test à l'aveugle a été appliquée lors de l'étude.
- échantillons cryopréservés (si applicable).

Résultats :

- modifications du poids corporel ;
- données relatives à la consommation d'aliments et d'eau (si elles sont disponibles) ;
- données sur les effets toxiques provoqués en fonction du sexe et de la dose, concernant notamment la fertilité, la gestation et tout autre signe de toxicité ;
- durée de la gestation ;
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, la progéniture, la croissance post-natale, etc. ;
- nature, gravité et durée des manifestations cliniques observées (réversibles ou non) ;
- nombre de femelles adultes présentant un cycle œstral normal ou anormal et durée du cycle ;
- nombre de petits vivants à la naissance et pertes après implantation ;
- données relatives au poids corporel des petits ;
- DAG de tous les petits (et poids corporel le jour de la mesure de la DAG) ;
- persistance du mamelon chez les petits mâles ;
- taux d'hormones thyroïdiennes chez les petits âgés de 13 jours et les mâles adultes (ainsi que chez les mères et chez les petits âgés de 4 jours si cela a été mesuré) ;
- nombre de petits présentant des anomalies évidentes, évaluation macroscopique des organes génitaux externes, nombre d'avortons ;
- indication du moment de la mort survenue pendant l'étude, ou si l'animal a survécu jusqu'à la fin ;
- nombre d'embryons implantés, taille et poids des portées au moment de la consignation de ces données;
- poids corporel lors du sacrifice et poids des organes des animaux de la génération parentale ;
- résultats de l'autopsie ;
- description détaillée de l'examen histopathologique ;
- données sur l'absorption (si elles sont disponibles) ;
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Examen des résultats.

Conclusions.

Interprétation des résultats

59. L'étude permettra d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement liée à l'administration de doses répétées (voir paragraphes 5 et 6). Elle pourrait aider à déterminer s'il y a lieu d'approfondir les recherches et fournir des orientations pour la conception d'études ultérieures. Le document d'orientation 43 de l'OCDE devra être consulté pour aider à l'interprétation des résultats liés à la reproduction et au développement (13). Le document d'orientation 106 de l'OCDE sur l'évaluation histologique des essais endocriniens et de reproduction chez les rongeurs (11) fournit des informations sur la préparation et l'évaluation des organes (endocriniens) et des frottis vaginaux ; ces informations peuvent être utiles dans le cadre de la présente Ligne directrice.

© OCDE (2025)

BIBLIOGRAPHIE

(1) OECD (1990). Document de Séance n°1 pour la 14ème Réunion Conjointe du Groupe des Produits Chimiques et du Comité de Gestion. Disponible sur demande, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the AD Hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27-29 October 1992. Disponible sur demande, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponible sur demande, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on testing and assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

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

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

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assesment (No. 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.o 106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2025). Guidance on Good Practices and Standardisation of Sample Collection for Omics Analysis. Series on Testing and Assessment, No. 409. ENV Publishing, OECD, Paris

© OCDE (2025)

(13) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

© OCDE (2025)

ANNEXE 1

DEFINITIONS (voir aussi le GD 150 (6))

Activité antithyroïdienne : c'est la capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T_3) chez un organisme mammifère.

Activité thyroïdienne : c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T_3) chez un organisme mammifère.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

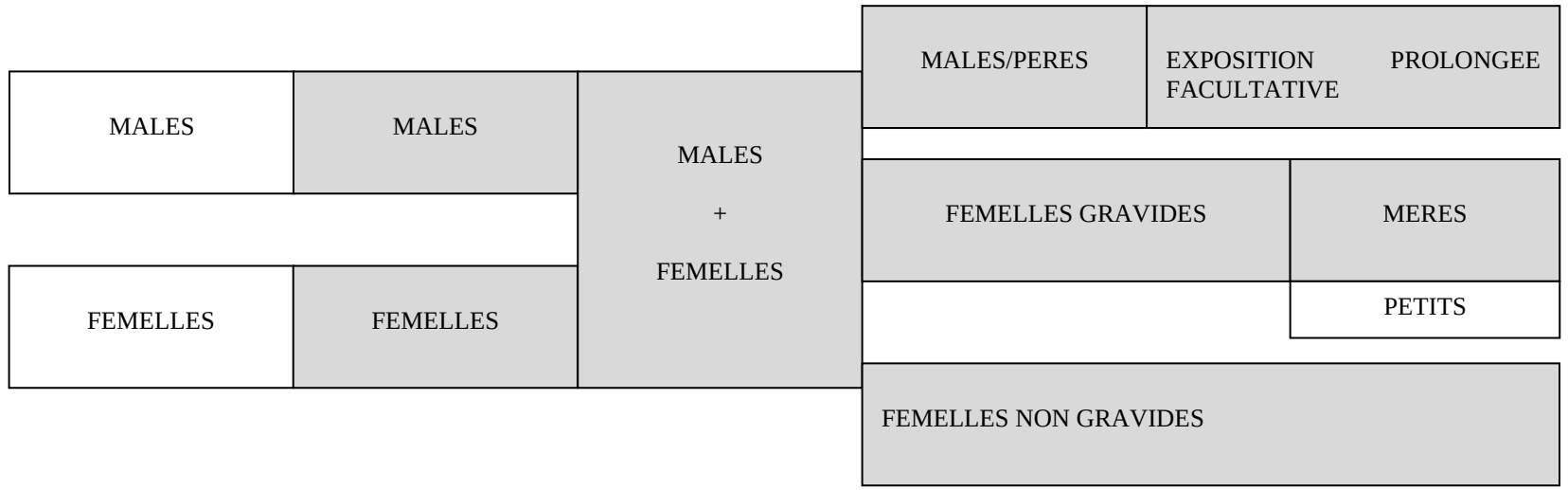
© OCDE (2025)

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

© OCDE (2025)

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

© OCDE (2025)



Début de l'étude

Évaluation avant exposition du cycle œstral, suivi de l'observation quotidienne des frottis vaginaux du début du traitement jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré

Administration du produit chimique d'essai

Pas d'administration du produit chimique d'essai

Autopsie des mâles/pères (après une période d'administration de 4 semaines minimum)

De la parturition (JPN 0) à JPN 4 : DAG chez tous les petits (JPN 0-JPN 4 ; le même jour)
Sacrifice de 2 petits par portée pour évaluation de T4 (JPN 4)

13è jour post-partum
Autopsie des femelles et petits
Persistance du mamelon chez les petits mâles
Autopsie des mâles/pères (facultative)

© OCDE (2025)

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

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

(1) dernier jour de la période d'accouplement

© OCDE (2025)