Adoptée :
17 décembre, 2001

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

Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë

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 ou des changements dans les pratiques d'évaluation. La Ligne directrice 423 d'origine a été adoptée en mars 1996 comme deuxième méthode alternative pour l'essai de toxicité aiguë conventionnel décrit dans la Ligne directrice 401. Suite aux recommandations de plusieurs réunions d'experts, la révision était opportune car i) un accord international sur les valeurs limites harmonisées des DL50 utilisées dans la classification de substances chimiques avait été réalisé, ces valeurs étant différentes de celles préconisées dans la version de 1996 de la Ligne directrice, et ii) il est maintenant jugé suffisant d'effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, généralement des femelles.

2. La méthode par classe de toxicité aiguë (1) décrite dans la présente Ligne directrice est un processus séquentiel utilisant trois animaux d'un seul sexe par étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette procédure est reproductible, utilise très peu d'animaux et, comparée aux autres méthodes de toxicité aiguë (Lignes directrices 420 et 425), cette méthode permet de classer des substances par ordre de toxicité de façon similaire. La méthode par classe de toxicité aiguë est basée sur des évaluations biométriquess (2)(3)(4)(5) avec des doses prédéterminées, convenablement séparées pour permettre de classer une substance pour des besoins de classification et d'évaluation des dangers. La méthode, telle qu'elle a été adoptée en 1996, a été validée de manière extensive *in vivo* par rapport à des données de LD50 de la littérature, tant sur le plan national (6) qu'international (7).

3. Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (8). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la Ligne directrice 423.

4. On trouvera à l'Annexe 1 les définitions des termes utilisés dans cette Ligne directrice.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

5. Il ne faut pas administrer des substances d'essai à des niveaux de dose dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, on doit tuer avec humanité les animaux moribonds et les animaux qui souffrent de façon manifeste ou qui montrent des signes de détresse grave. Ces animaux doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider de tuer les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (9).

6. La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances dans le Système de classification globalement harmonisé (SGH) de substances entraînant de la toxicité aiguë (10).

7. La méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL50. Comme la mort d'une partie des animaux reste le principal effet observé, la méthode permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée létale. Une DL50 peut être déterminée seulement dans le cas où au moins deux doses donnent une mortalité supérieure à 0% et inférieure à 100%. Grâce à l'utilisation d'un choix de doses prédéterminées, indépendamment de la substance d'essai, et le lien explicite entre classification et nombre d'animaux dans différents états observés, la cohérence entre laboratoires est favorisée.

8. Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations contiendront l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo*, les données toxicologiques de substances structurellement apparentées et l'usage escompté de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux par étape, des informations sur la toxicité aiguë de la substance sont obtenues qui sont suffisantes pour les besoins de classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe (normalement des femelles) sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire:

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

10. Des détails concernant le mode opératoire sont décrits en Annexe 2. La méthode rend possible d'exercer un jugement concernant la classification de la substance d'essai dans une classe de toxicité délimitée par des valeurs préalablement fixées de DL50.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix de l'espèce animale

11. Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Normalement on utilise des femelles (9). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL50 permet de conclure qu'il y a peu de différence de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont généralement légèrement plus sensibles (11). Cependant, si la connaissance des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins indique que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas il faut fournir une justification adéquate.

12. Il faut prendre des animaux adultes sains provenant de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit

être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer à un intervalle de ± 20 % par rapport au poids moyen des animaux précédemment exposés.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

13. La température du local des animaux d'expérience doit être de 22°C (± 3°C). Le taux d'humidité relative devrait être 30% au moins et ne pas dépasser 70%. Sauf pendant le nettoyage de la salle, une humidité relative entre 50 et 60% est idéale. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

Préparation des animaux

14. Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

Préparation des doses

15. En général, la substance d'essai doit être administrée à volume constant pour toute la gamme de doses en variant la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de dette substance. Certaines autorités réglementaires le veulent ainsi. Dans aucun cas, le volume de dose maximal ne peut être dépassé. Le volume maximal de liquide qui peut être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Pour les rongeurs, le volume ne doit pas dépasser 1 mL/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 mL/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution (ou suspension ou émulsion) aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

MODE OPERATOIRE

Administration des doses

16. La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

17. Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance ; pour les rats on supprime la nourriture, mais pas l'eau, pendant la nuit et pour les souris on supprime la nourriture, mais pas l'eau, pendant 3 à 4 heures. Après la période de jeune, les animaux doivent être pesés et puis la substance d'essai leur est administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

Nombre d'animaux et niveaux des doses

18. Chaque étape nécessite trois animaux. Pour la dose initiale on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer de la mortalité parmi quelques-uns des animaux traités. Les schémas de l'Annexe 2 décrivent le mode opératoire à suivre pour chacune des doses initiales.

19. Lorsque des informations sont disponibles qui suggèrent une mortalité peu probable au niveau de dose initial le plus élevé (2000 mg/kg de poids corporel), il faut procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée pour des raisons liées au bien-être des animaux est 300 mg/kg.

20. L'intervalle de temps entre l'administration de chaque niveau de dose est dicté par le moment du début, la durée et la sévérité des effets toxiques observés. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu.

21. Exceptionnellement, et lorsque cela est justifié pour répondre à une exigence découlant d'un besoin spécial d'une réglementation, on peut prendre en considération d'utiliser une dose prédéterminée maximale supplémentaire de 5000 mg/kg (voir Annexe 3). L'essai de substances en catégorie 5 du SCGH (2000-5000 mg/kg) doit être découragé pour des raisons de protection des animaux. Un tel essai est seulement envisageable lorsqu'il y a une forte probabilité que les résultats seront des éléments importants pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

Essai limite

22. L'essai limite est utilisé principalement lorsque des informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique sont disponibles, c.à.d. que la toxicité se situe au dessus de la dose limite réglementaire. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être recueillies à partir de connaissances de substances, produits ou mélanges similaires déjà soumis à essai, prenant en compte l'identité et le pourcentage des composants connus pour avoir une importance du point de vue toxicologique. Quand on ne dispose d'aucune ou de peu d'informations concernant la toxicité, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut exécuter l'essai principal.

23. Un essai limite à un niveau de dose de 2000 mg/kg peut être exécuté avec six animaux (trois animaux par étape). Exceptionnellement, un essai limite à un niveau de dose de 5000 mg/kg peut être conduit avec trois animaux (voir Annexe 3). Si de la mortalité liée à la substance se produit, il peut être nécessaire de tester au niveau de dose immédiatement inférieur.

OBSERVATIONS

24. Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement. Une attention particulière s'impose pendant les premières 4 heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance, à l'exception des animaux qui sont morts au cours de l'étude ou qui sont retirés de l'étude et tués avec humanité pour des raisons de protection des animaux. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée d'une manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération. Elle peut par conséquent être prolongée, si nécessaire. Les moments où apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, particulièrement quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes (12) Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

25. D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le Document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (9). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être tués pour des raisons humanitaires. Quand les animaux sont tués pour des raisons humanitaires ou si on les retrouve morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

Poids corporel

26. Le poids individuel de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et ensuite au moins une fois par semaine. Les changements de poids doivent être calculés et enregistrés. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis tués avec humanité.

Pathologie

27. Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons de protection des animaux) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car cet examen peut fournir des renseignements utiles.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

28. Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant pour chaque groupe d'essai le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou tués pour des raisons humanitaires, pour chaque animal le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité et les résultats de l'autopsie.

Rapport d'essai

29. Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris les isomères);
- données relatives à l'identification, numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule, lorsque celui-ci n'est pas de l'eau.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisées;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu;
- nombre, âge et sexe des animaux (la justification de l'utilisation de mâles à la place de femelles, le cas échéant;
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

- formulation détaillée de la substance d'essai, y compris l'état physique du produit administré;
- détails sur le mode d'administration, volume des doses et moment de l'administration;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance et celle de l'eau);
- la justification du choix de la dose initiale.

Résultats:

- tableau des résultats et niveau de dose pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de la mortalité, nature, gravité et durée des effets);
- tableau des poids corporels et changements de poids;
- poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite par intervalles d'une semaine, et au moment de la mort ou du sacrifice;
- date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le sacrifice;
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité;
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et toutes les observations histo-pathologiques.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method -– An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2000) Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Il y a toxicité orale aiguë si des effets défavorables apparaissent après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt, ni apparaît moribond, en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

La dose est la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg).

SGH: Système de classification globalement harmonisé. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du Comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du B.I.T (communication des dangers) et coordonnée par IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Il y a mort imminente lorsq'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort intervienne avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [pour de plus amples détails voir (9)].

DL50 (dose létale 50%) par voie orale: dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL50 est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite réfère à une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2000 ou 5000 mg/kg).

État moribond: l'état avant la mort ou l'incapacité de survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails voir (9)].

Mort prévisible: la présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment futur connu avant la fin projetée de l'expérience, par exemple l'incapacité d'atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails voir (9)].

ANNEXE 2

MODE OPERATOIRE A SUIVRE POUR CHACUNE DES DOSES INITIALES

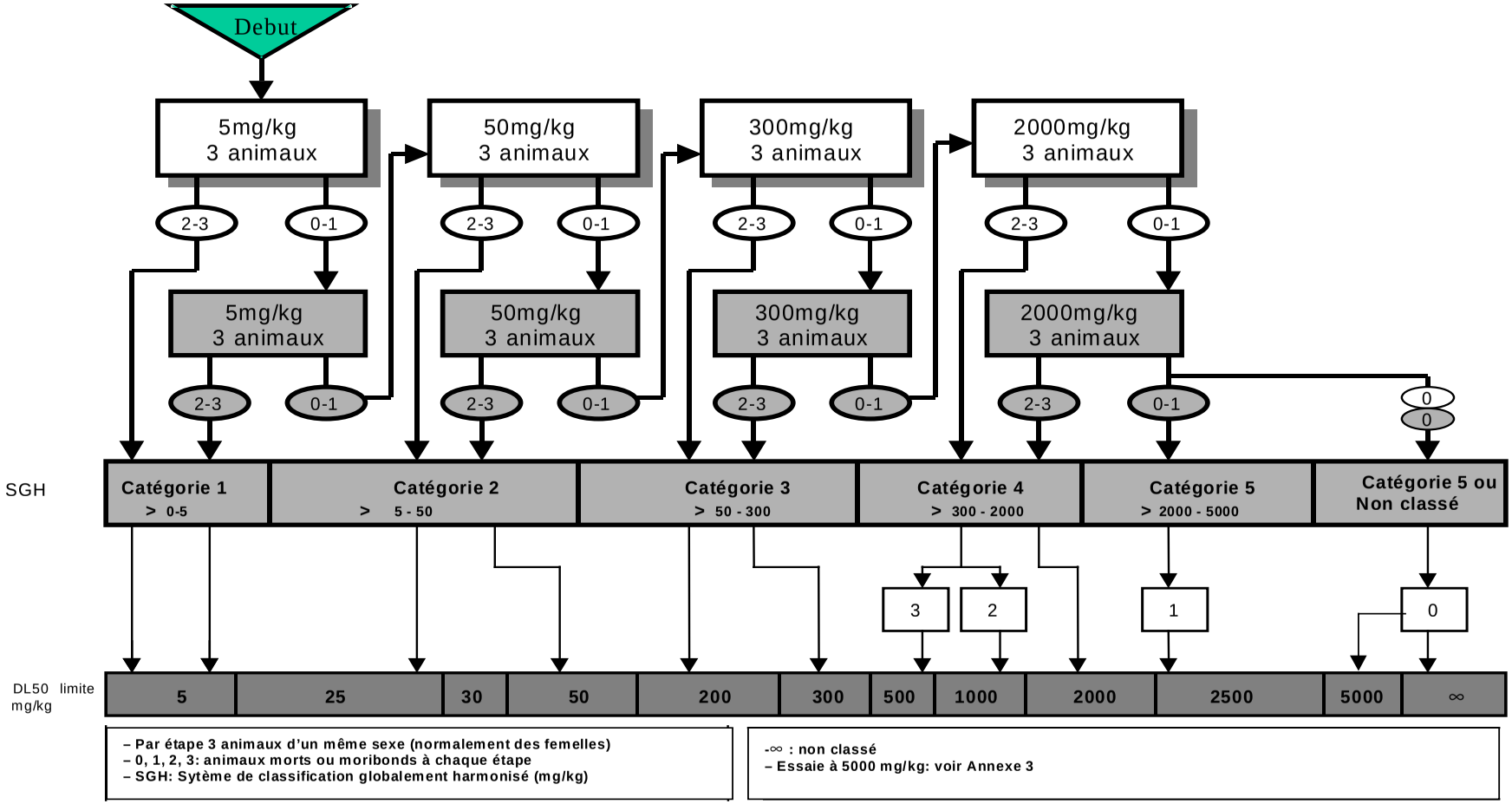
REMARQUES GENERALES

1. Pour chaque dose initiale, les différents schémas d'essai qui figurent à cette annexe donnent les processus à suivre.

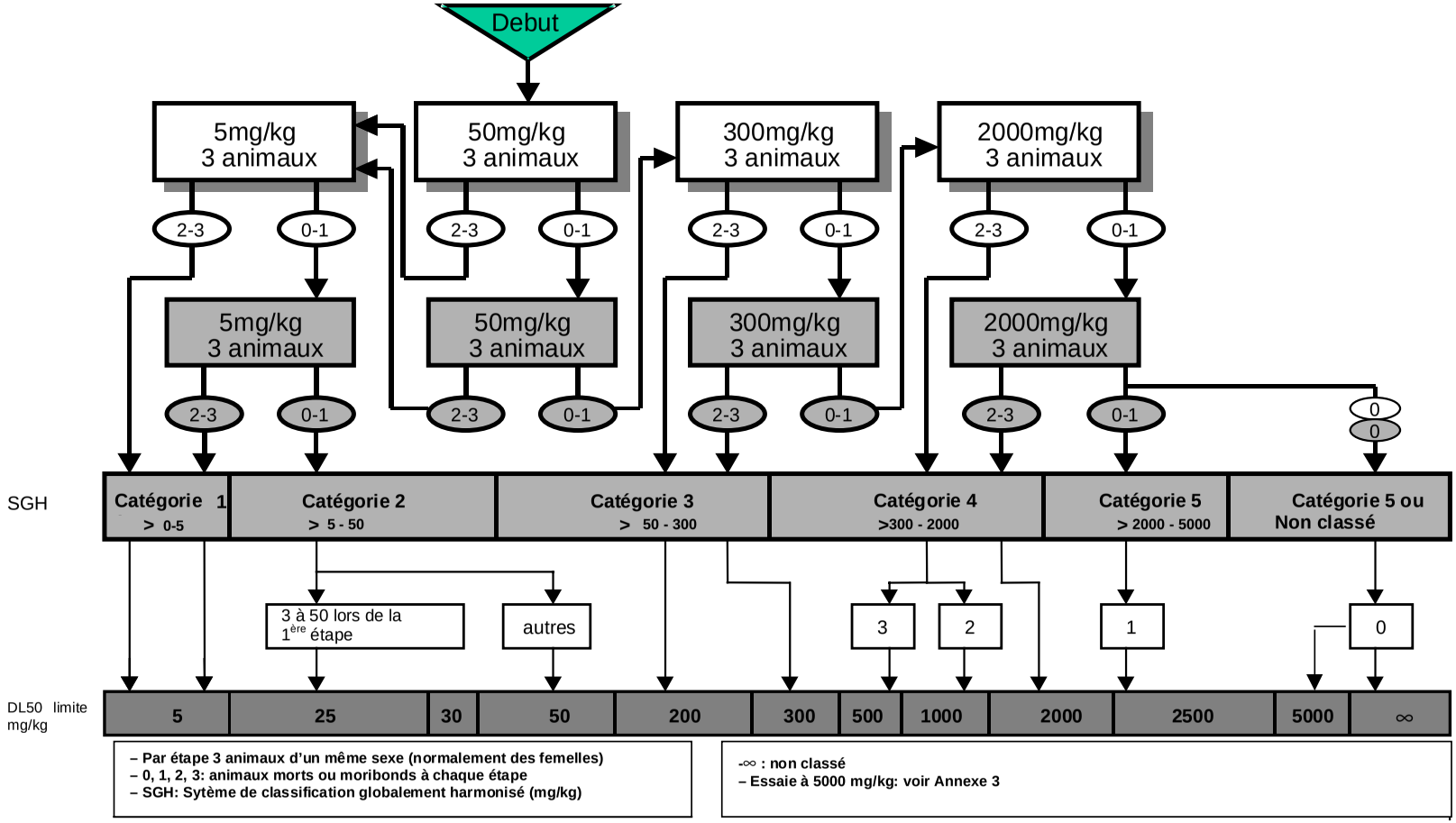
- Annexe 2 a: dose initiale de 5 mg/kg de poids corporel
- Annexe 2 b: dose initiale de 50 mg/kg de poids corporel
- Annexe 2 c: dose initiale de 300 mg/kg de poids corporel
- Annexe 2 d: dose initiale de 2000 mg/kg de poids corporel

Les différents processus sont indiqués par les flèches. Ils dépendent du nombre d'animaux morts ou tués pour des raisons d'humanité.

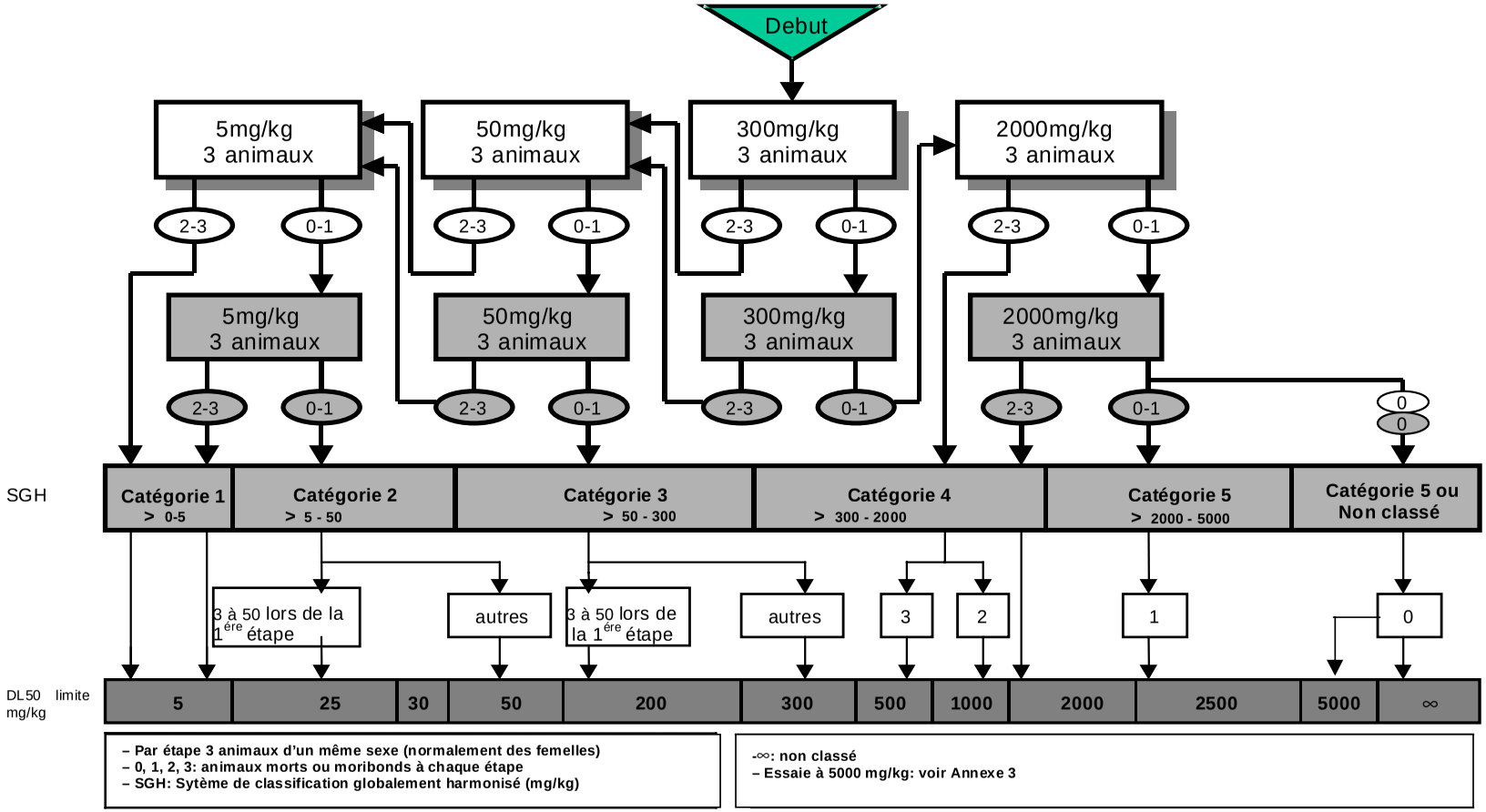
ANNEXE 2a: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 5 MG/KG



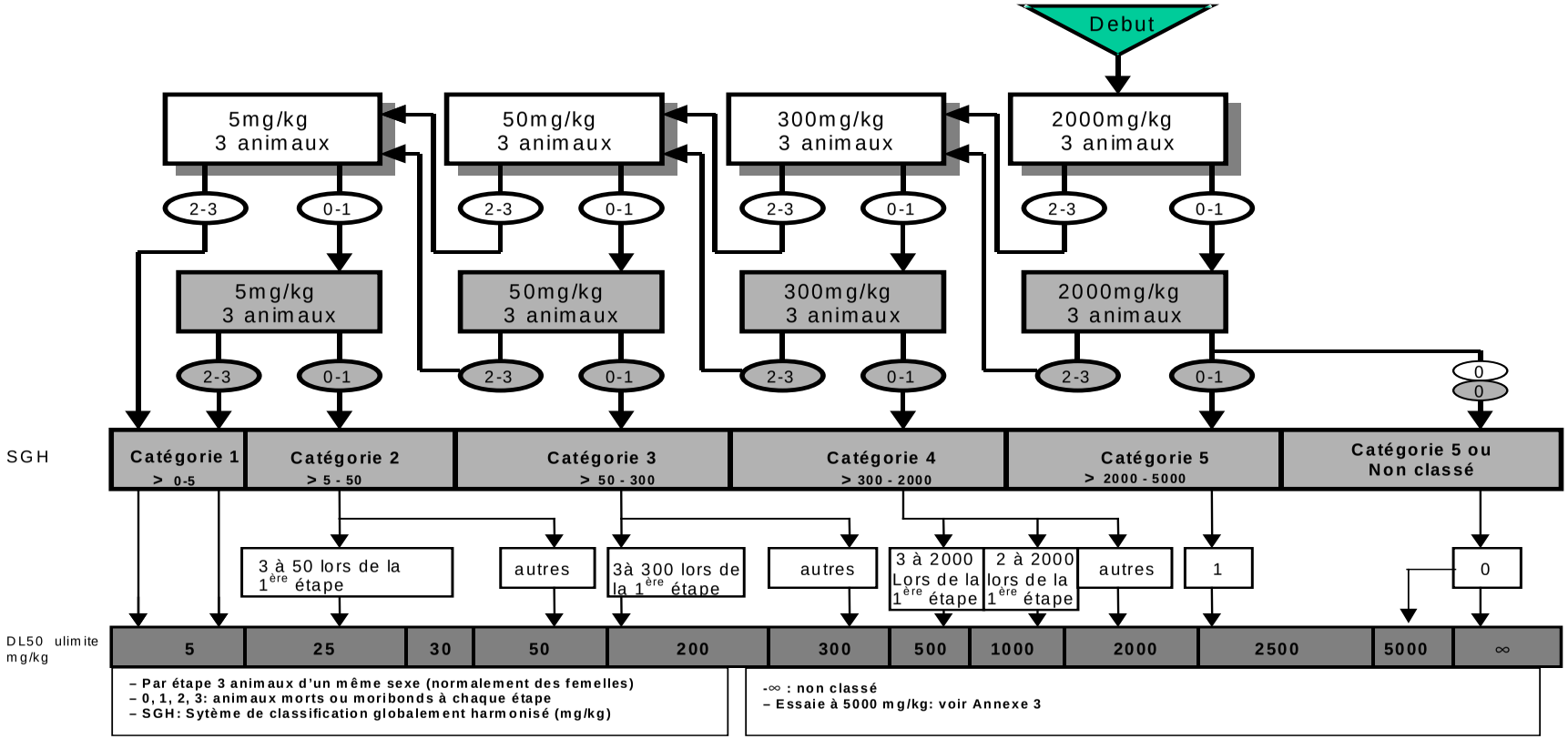
ANNEXE 2b: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 50 MG/KG



ANNEXE 2c: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG



ANNEXE 2d: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 2000 MG/KG



ANNEXE 3

CRITÈRES POUR CLASSER DES SUBSTANCES D'ESSAI AVEC UNE DL50 ATTENDUE SUPÉRIEURE À 2000 MG/KG SANS AVOIR RECOURS À L'ESSAI

1. Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à l'identification de substances dont la toxicité aiguë est relativement faible mais qui peuvent, sous certaines conditions, être dangereuses pour des populations vulnérables. La DL50 orale ou dermale de ces substances est escomptée se situer dans la gamme 2000-5000 mg/kg ou de doses équivalentes par d'autres routes. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2000 mg/kg<DL50<5000 mg/kg, dans les cas suivants:

a) si, sur la base de l'incidence de mortalité, l'un quelconque des schémas de l'Annexe 2a-2d dirige la substance vers cette catégorie;

b) si l'on possède des indications fiables que la DL50 se situera dans la gamme de la catégorie 5; ou si d'autres études sur des animaux ou des observations d'effets toxiques constatés chez l'homme suscitent des inquiétudes motivées pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, si la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée et

- l'on possède des informations fiables indiquant des effets toxiques significatifs pour l'homme, ou
- de la mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
- lorsq'un jugement d'expert confirme des signes cliniques significatifs de toxicité dans un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis la diarrhée, les modifications des poils ou un aspect mal soigné, ou
- quand un jugement d'expert confirme des informations fiables indiquant des effets aigüs potentiellement significatifs sur la base des autres études sur animaux.

DES ESSAIS À DES DOSES SUPÉRIEURES À 2000 MG/KG

2. Pour des raisons liées à la protection du bien-être des animaux, l'essai sur animaux de substances de la catégorie 5 (5000 mg/kg) doit être découragé. Il est seulement envisageable lorsqu'il y a une forte probabilité que les résultats d'un tel essai seront des éléments importants pour la protection de la santé des hommes et des animaux (10). Aucun essai à un niveau de dose supérieur doit être entrepris.

3. Lorsqu'un essai à 5000 mg/kg est nécessaire, seulement une étape(avec trois animaux) est requise. Si le premier animal traité meurt, le traitement continue avec 2000 mg/kg comme cela est indiqué dans les schémas de l'Annexe 2. Si le premier animal traité survit, deux autres animaux sont traités. S'il y a seulement un mort parmi les trois animaux, la valeur de la DL50 est estimée supérieure à 5000 mg/kg. Si les deux autres animaux survivent, le traitement continue avec 2000 mg/kg.