424

Adoptée :
21 juillet 1997

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

Etude de neurotoxicité

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont périodiquement revues en fonction des progrès scientifiques qui sont réalisés dans les domaines de l'identification des dangers et du développement des données y afférent. Des propositions pour des nouvelles Lignes directrices ou des mises à jour de Lignes directrices existantes peuvent être soumises par les pays Membres, par le Secrétariat, ainsi que par la communauté scientifique internationale. La procédure est décrite dans la Monographie sur l'Environnement de l'OCDE n^{o} 76 (1).

2. Un premier projet de Ligne directrice pour une étude de neurotoxicité fut élaboré lors d'une réunion ad hoc de l'OCDE sur les essais de neurotoxicité à Washington DC en mars 1990 (2). Ce projet fut réexaminé en février 1992 lors d'une réunion consultative d'un groupe d'experts en toxicité systémique à court terme et neurotoxicité (différée) tenue à Paris (3). En dernier lieu, un groupe de travail ad hoc de l'OCDE sur la neurotoxicité réuni à Ottawa en mars 1995 (6) a établi le texte définitif .sur la base des travaux antérieurs, de la Ligne directrice sur la neurotoxicité de USEPA (4)(5) et d'une proposition émanant du Canada. Ce groupe a également pris en compte des commentaires des Coordonnateurs nationaux du Programme de l'OCDE sur les Lignes directrices pour les essais des produits chimiques.

3. Cette Ligne directrice est conçue dans le but de recueillir des données permettant de confirmer ou mieux caractériser une neurotoxicité potentielle d'une substance pour des animaux adultes. Elle est construite de telle façon qu'elle puisse soit servir de cadre à une étude indépendante ou être combinée avec les Lignes directrices existantes d'études de toxicité à dose répétée. Il est recommandé de consulter le Document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies d'essais en matière de neurotoxicité (7). Cela est particulièrement important lorsqu'on envisage de dévier des observations et protocoles d'essai qui sont préconisés dans la Ligne directrice. Le Document d'orientation de l'OCDE est également utile lorsqu'il s'agit de choisir un protocole d'essai adaptée à un cas spécifique. L'évaluation de la neurotoxicité au stade du développement fait l'objet d'une Ligne directrice séparée (8).

CONSIDERATIONS INITIALES

4. Dans l'estimation et l'évaluation des propriétés toxiques d'un produit chimique il est important de prendre en considération la possibilité d'effets neurotoxiques. Des observations qui peuvent donner une première indication d'une neurotoxicité potentielle sont incluses dans les Lignes directrices sur la toxicité systémique à dose répétée. La présente Ligne directrice permet de concevoir une étude apportant des informations complémentaires sur les effets de neurotoxicité observés lors des études de toxicité systémique à dose répétée et éventuellement de confirmer ces effets.

Cependant, la neurotoxicité potentielle de substances appartenant à certaines catégories peut être évaluée de façon plus appropriée en suivant directement la présente Ligne directrice sans recueillir au préalable les indications qui peuvent être fournies par des études de toxicité systémique à dose répétée. Il en est ainsi lorsque:

- des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée ou lorsque les substances présentent des similitudes de structure, ou

- ont d'autres caractéristiques en commun, avec des substances neurotoxiques connues.

5. Il peut y avoir d'autres cas dans lesquels il est approprié de suivre cette Ligne directrice ; pour plus de détails, voir le Document d'orientation de l'OCDE sur la neurotoxicité (7).

6. Cette Ligne directrice est construite de façon de permettre son adaptation à des besoins spécifiques de confirmation de la neurotoxicité histopathologique ou de la neurotoxicité de comportement d'une substance et de caractériser et de quantifier les réponses neurotoxiques.

7. Par le passé, la neurotoxicité était assimilée à de la névropathie comportant des lésions névropathologiques ou des dysfonctionnements neurologiques, tels que apoplexie, paralyse ou tremblements. Il est maintenant évident que, quoique la névropathie est une manifestation importante de neurotoxicité, de nombreux autres signes de toxicité pour le système nerveux (par exemple, perte de la coordination motrice, déficits sensoriels, diminutions de la faculté d'apprendre et de la mémoire) ne sont pas mis en évidence dans les études de névropathologie et autres.

8. Cette Ligne directrice de neurotoxicité est conçue pour détecter dans des rongeurs adultes des effets importants sur le comportement et des effets névropathologiques. Tandis que des effets sur le comportement, même s'ils ne sont pas accompagnés de changements morphologiques, peuvent révéler un impact néfaste sur l'organisme, les changements de comportement ne sont pas tous spécifiques du système nerveux. Pour cette raison, si des changements sont observés ceux-ci doivent être évalués par rapport à des données histopathologiques, hématologiques ou biochimiques et à des résultats d'autres études de toxicité systémique. Afin de caractériser et de quantifier les réponses neurotoxiques, les essais préconisés dans cette Ligne directrice comportent des procédures de histopathologie et des procédures portant sur le comportement, qui peuvent être étayées par des recherches d'électrophysiologie et/ou de biochimie (7)(8)(9)(10).

9. Les agents neurotoxiques peuvent agir sur différentes cibles présentes dans le système nerveux et cela par différents mécanismes. Comme il est impossible de construire un seul ensemble d'essais permettant de faire une évaluation approfondie du potentiel neurotoxique de toutes les substances, il peut être nécessaire de mettre en oeuvre d'autres essais *in vivo* ou *in vitro* qui sont adaptés au type spécifique de neurotoxicité observé ou escompté.

10. En s'appuyant sur le Document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies et les méthodes d'essais en matière de neurotoxicité on peut sur la base de cette Ligne directrice concevoir des études dont le but sera de préciser la relation entre dose et effet. Par ces études on pourra obtenir une meilleure estimation du niveau sans effet observé ou mieux identifier les dangers connus ou escomptés. Ainsi, des études peuvent être conçues pour identifier et évaluer le ou les mécanisme(s) de neurotoxicité ou pour compléter les données déjà disponibles à partir des protocoles de base d'observations du comportement et d'observations névropathologiques. Dans ces genres d'études il est inutile d'obtenir en double des données qui seraient de toute façon obtenues en suivant les protocoles recommandés dans cette Ligne directrice, si ces données sont déjà disponibles et ne sont pas nécessaires pour l'interprétation des résultats de l'étude.

11. Les informations recueillies dans cette étude de neurotoxicité , qu'elle soit faite seule ou en combinaison, permet de :

- déterminer que la substance a atteint le système nerveux de manière permanente ou réversible ;
- mieux caractériser les altérations du système nerveux dues à l'exposition à la substance et, de préférence, aider à comprendre le mécanisme sous-jacent ;
- déterminer les relations entre dose et effet et entre temps et effet et d'en déduire une estimation du niveau sans effet nocif observé (lequel peut servir à établir les critères de sécurité de la substance).

12. Dans cette Ligne directrice, la substance d'essai est administrée par voie orale. Si d'autres voies, comme la voie dermique ou l'inhalation, paraissent plus appropriées, des modifications des procédures recommandées s'imposent. Le choix de la route d'administration est dicté par le profile de l'exposition humaine et par l'information toxicologique et cinétique disponible.

13. Les définitions de certains des termes utilisés sont présentées en annexe.

PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

14. La substance à tester est administrée par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de rongeurs. Il est généralement fait appel à des doses répétées sur une période qui peut être de 28 jours, de 90 jours (étude subchronique) ou d'une année ou plus (étude chronique). Les procédures décrites dans cette Ligne directrice peuvent également être appliquées dans le cas d'une étude de neurotoxicité aigüe. Les animaux sont soumis à essai afin de détecter ou de caractériser des anomalies de comportement ou d'ordre neurologique. Au cours de chaque période d'observation différents aspects du comportement qui pourraient être indicatifs d'une atteinte neurotoxique sont évalués. A la fin de l'essai une partie des animaux de chaque groupe et de chaque sexe sont perfusés in situ et des coupes du cerveau, de la moelle épinière et de nerfs périphériques sont préparées et examinées.

15. Lorsque l'étude est conduite de façon indépendante pour dépister une neurotoxicité ou caractériser des effets neurotoxiques, les animaux de chaque groupe qui ne sont pas utilisés pour la perfusion et l'histopathologie (voir Tableau 1) peuvent servir dans les examens du comportement et les examens névropathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques qui permettent de compléter les données recueillies dans les observations de base préconisées dans la Ligne directrice (7). Ces examens complémentaires peuvent être particulièrement utiles lorsque des observations empiriques ou des effets escomptés indiquent un type ou une cible spécifique de la neurotoxicité engendrée par la substance chimique. Une autre possibilité est d'utiliser les animaux restants dans des évaluations comme celles qui sont mentionnées dans les Lignes directrices d'études de toxicité à doses répétées dans des rongeurs

16. Si les procédures de la présente Ligne directrice sont combinées avec celles d'une autre Ligne directrice il faut des animaux en nombre suffisant pour satisfaire les exigences en matière d'observations des deux études.

DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

Choix des espèces animales

17. Le rat est l'espèce préférée, bien que d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées moyennant une justification du choix. Il faut recourir à des souches généralement utilisées en laboratoire. Les animaux doivent être adultes, jeunes et sains. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration des doses doit débuter aussitôt après le sevrage et, de préférence avant que les animaux n'atteignent six semaines d'âge et en tout cas avant que les animaux n'atteignent neuf semaines. Il peut y avoir un ajustement de ces conditions d'âge dans le cas où cette étude-ci est combinée avec d'autres études. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux doivent ne pas dépasser plus ou moins 20 pour cent du poids moyen de chaque sexe. Si une étude de toxicité orale à dose répétée de faible durée constitue un essai préliminaire à une étude à long terme, il faut utiliser des animaux de la même souche et de la même source dans les deux études.

Conditions d'encagement et d'alimentation

18. La température du laboratoire doit être de 22 °C (± 3 °C). Le taux d'humidité relative doit être compris entre 30 pour cent et 70 pour cent, sauf au cours du nettoyage du local, l'idéal étant 50-60 pour cent. Pour l'éclairage, on doit utiliser la lumière artificielle et respecter une séquence de 12 heures d'éclairement et de 12 heures d'obscurité. Les bruits forts intermittents sont à bannir. Le régime alimentaire peut être un régime de laboratoire classique avec de l'eau potable à satiété. Le choix du régime peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux peuvent être placés dans des cages soit individuellement, soit par petits groupes du même sexe.

Préparation des animaux

19. Des animaux jeunes et sains sont choisis au hasard pour être répartis entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de manière à minimiser les effets possibles dus à l'agencement des cages. Les animaux sont marqués individuellement afin de permettre leur identification. Ils sont maintenus dans les cages pendant cinq jours au moins avant le début de l'étude pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

Routes d'administration et préparation des doses

20. Dans cette Ligne directrice il est spécifiquement fait mention de la route orale d'administration. La substance à tester peut être administrée par gavage ou en capsules ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson. D'autres voies, comme la voie dermique ou l'inhalation, peuvent être utilisées. Dans ce cas, des modifications dans les procédures peuvent être nécessaires. Le choix de la route d'administration est dicté par le profile de l'exposition humaine et par l'information toxicologique et cinétique disponible. Les raisons qui ont conduit au choix de la route d'administration et les modifications apportées au procédures doivent être données.

21. Lorsque cela s'avère nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé de privilégier, dans toute la mesure du possible, l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse. A défaut, on peut utiliser une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple) et, enfin, une solution dans d'autres milieux. Lorsque le véhicule n'est pas aqueux, il faut en connaître les propriétés toxiques. D'autres caractéristiques du véhicule peuvent avoir de l'importance : des effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la rétention de la substance d'essai ; des effets sur les propriétés chimiques de la substance pouvant

altérer sa toxicité ; également des effets sur la consommation de nourriture et d'eau ou sur l'état nutritionnel des animaux.

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

22. Lorsqu'il s'agit d'une étude indépendante, il faut utiliser au moins vingt animaux (dix femelles et dix mâles) dans chaque groupe de traitement et de contrôle pour les observations cliniques et fonctionnelles. A la fin de l'étude, au moins cinq mâles et cinq femelles sont prélevés parmi les dix mâles et dix femelles pour être perfusés in situ et soumis à des examens névro- et histo-pathologiques. Lorsque dans un groupe de dosage seulement peu d'animaux sont observés pour des signes d'effets neurotoxiques, il faut inclure ces animaux parmi ceux qui sont infusés. Si l'étude est conduite en combinaison avec une étude de toxicité à doses répétées, le nombre des animaux doit être suffisant pour satisfaire aux exigences en animaux des deux études. Le Tableau 1 donne les nombres minimaux pour différentes combinaisons d'études. S'il est prévu de sacrifier des animaux avant le terme de l'étude ou de constituer des groupes pour l'observation de la réversibilité, la persistance ou l'apparition différée d'effets toxiques après traitement, ou si des observations complémentaires sont envisagées, le nombre doit être majoré pour faire face aux exigences de l'observation et d'histopathologie.

Groupes de traitement et de contrôle

23. En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes d'animaux traités et d'un groupe témoin. Cependant, au cas où il ressortirait de l'évaluation d'autres données qu'on ne doive pas s'attendre à des effets à une dose répétée de 1000 mg/kg de poids corporel/jour, on peut procéder à un essai limite. Si l'on ne dispose pas de données adéquates, on peut mener une étude préliminaire visant à délimiter la gamme des niveaux de doses à utiliser. A part leur exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités exactement de la même manière que les animaux des groupes traités. Si la substance à tester est incorporée dans un véhicule, le groupe témoin doit en recevoir un volume égal au plus grand utilisé dans les groupes de traitement.

Contrôle de la fiabilité

24. Des données doivent être présentées qui démontrent que le laboratoire est capable d'effectuer l'étude et que la sensibilité des procédures est garantie. Ces données doivent constituer une preuve évidente de la faculté du laboratoire à détecter, et le cas échéant à mesurer, les changements intervenant dans les différents effets dont l'observation est requise. Parmi ces effets il y a les réactions neurovégétatives, la réactivité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice. Les références 8 à 15 contiennent des informations sur des substances qui provoquent différents types de réponses neurotoxiques et qui peuvent servir de témoins positifs. Des données en la possession du laboratoire peuvent également servir si elles ont été obtenues dans des études antérieures mettant en oeuvre des procédures présentant les mêmes aspects essentiels. Il est recommandé de mettre de telles données périodiquement à jour. Chaque fois que le laboratoire modifie un élément essentiel de la conduite de l'essai, de nouvelles données doivent être réunies pour démontrer que la sensibilité des procédures est maintenue.

Choix des doses

25. Les niveaux de dose doivent être choisis en fonction de ce que l'on connaît de la toxicité et de la toxico-cinétique de la substance d'essai ou de substances de structure analogue. La dose la plus

élevée devrait être choisie avec le but de provoquer des effets neurotoxiques ou des effets de toxicité systémique manifeste. A partir de là, les niveaux de dose iront en ordre décroissant de façon à mettre en évidence toute relation entre dose et effet et l'absence d'effets nocifs observables au niveau de la dose la plus faible (CSENO). Les niveaux de doses doivent être tels que les effets primaires sur le système nerveux peuvent être distingués des effets de toxicité systémique. Deux ou trois intervalles entre niveaux successifs est fréquemment la meilleure solution et il est souvent préférable d'ajouter un quatrième groupe d'essai plutôt que de fixer des intervalles trop espacés (par exemple dépassant un facteur dix) entre les niveaux de dose. Lorsque des estimations réalistes de l'exposition humaine existent il faut en tenir compte.

Essai limite

26. Si un étude, faisant appel aux méthodes décrites ci-dessus, à un niveau de dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ne provoque aucun effet toxique observable et si, sur la base de données obtenues à partir de composés de structure analogue, on ne s'attend à aucune toxicité, on peut considérer qu'une étude approfondie mettant en jeu trois niveaux de dose n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine escomptée une dose plus forte peut être indiquée pour l'essai limite. Pour d'autres voies d'administration, comme l'inhalation ou l'application dermique, les propriétés physiques et chimiques de la substance imposent souvent des limites au niveaux de doses que l'on peut atteindre. Dans le cas d'une étude orale aiguë la dose de l'essai limite doit être au moins 2000 mg/kg.

Administration des doses

27. La substance à tester est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours par semaine, sur une période de 28 jours. L'administration à raison de cinq jours par semaine ou l'adoption d'une période d'exposition plus courte demandent à être justifiées. Lorsque la substance est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où il peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite pour les substances irritantes ou corrosives, qui donneraient normalement lieu à des effets fortement amplifiés à des concentrations plus élevées, il convient de minimiser les variations du volume administré en ajustant la concentration de façon à maintenir un volume constant à tous les niveaux de dose.

28. Au cas où la substance est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il importe que les quantités de substance utilisées ne modifient pas les bilans nutritionnels ou hydriques normaux. Lorsque la substance est administrée dans la nourriture, deux possibilités sont offertes : soit le maintien d'une concentration constante (exprimée en ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. Il convient de préciser l'option choisie. Lorsque la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à la même heure et la quantité doit être ajustée de manière à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'un essai à dose répétée sert d'étude préliminaire à une étude à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études. Dans les études aiguës la dose peut être administrée par fractions sur une période n'excédant pas 24 heures si une dose unique n'est pas possible.

OBSERVATIONS

Fréquence des observations et essais

29. Dans les études à doses répétées la période d'observation doit s'étendre sur toute la période de traitement. Dans les études aiguës les observations sont poursuivies pendant 14 jours après le traitement. Les animaux de groupes satellites (qui sont maintenus sans traitement après la période de traitement) sont observés également pendant 14 jours.

30. Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour favoriser la détection de toute anomalie de comportement ou d'ordre neurologique. Les observations se font de préférence chaque jour au même moment et pendant la période au cours de laquelle les effets attendus du traitement sont le plus prononcés. Le Tableau 2 résume la fréquence des observations cliniques et fonctionnelles. Si des données de cinétique et autres, obtenues dans des études antérieures, indiquent que d'autres moments au cours de la journée sont plus propices aux observations, essais ou observations après traitement, un échéancier différent doit être adopté afin de recueillir le plus d'informations possibles. Les raisons pour un changement des horaires doivent être données.

Observations de l'état de santé général et de mortalité et morbidité

31. Tous les animaux font l'objet d'un constat minutieux de leur état général au moins une fois par jour, et d'un constat de morbidité et de mortalité au moins deux fois par jour.

Examens cliniques approfondis.

32. Tous les animaux choisis pour être soumis à un examen clinique approfondi (voir Tableau 1) subissent cet examen une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même individu) et à plusieurs intervalles après, en fonction de la durée de l'étude (voir Tableau 2). Les groupes satellites destinés à l'observation de la réversibilité sont examinés à la fin de la période de rétablissement. Ces examens doivent être effectués hors de la cage habituelle, sur une aire standard. Les résultats doivent être soigneusement consignés, de préférence en utilisant des systèmes de cotation basés sur des critères ou des échelles de cotation pour chaque mesure effectuée. Les critères et échelles doivent être explicitement défini par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai (mis à part celles qui sont liées au traitement) et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs n'ayant pas connaissance du traitement.

33. Il est recommandé de faire les observations de façon structurée en appliquant des critères bien définis (y compris la définition de la normalité) systématiquement à chaque animal et à chaque moment d'observation. Les données utilisées pour définir le niveau normal doivent être présentées. Tous les signes observés doivent être consignés. La magnitude des signes observés est également consignée chaque fois que cela est possible. Les symptômes consignés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive) : modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives (sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, rythme respiratoire inhabituel, respiration par la bouche, tous signes inhabituels de miction ou défécation, urine décoloré, par exemple).

34. Il convient également de consigner toute réponse inhabituelle par rapport à la position du corps, au niveau d'activité (par exemple une exploration accrue ou diminuée de l'aire standard) et à la coordination des mouvements. Il convient également de consigner les modifications dans la démarche (dandinement, ataxie, par exemple), dans la posture (dos arrondi par exemple) et la

réaction à la manipulation, au placement et autres incitations ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, convulsions et tremblements, des comportements stéréotypés (par exemple toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou comportements bizarres (par exemple tendance à mordre, léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation) ou agression.

Observations fonctionnelles

35. De manière similaire aux observations cliniques, des observations fonctionnelles sont faites dans tous les animaux sélectionnés dans ce but, une fois avant l'exposition et fréquemment après (voir Tableau 1). La fréquence de ces observations dépend de la durée de l'étude (voir Tableau 2). En complément des périodes d'observation stipulées dans le Tableau 2, des observations fonctionnelles sont faites sur les groupes satellites aussi près que possible du sacrifice final. Les observations fonctionnelles comprennent la réactivité sensorielle à divers stimuli (par exemple stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs) (11)(12)(13), et il convient également d'évaluer la force de préhension (14) et l'activité motrice (15). Cette dernière doit être mesurée à l'aide d'un appareil automatisé capable de détecter des augmentations et des diminutions de l'activité. Si un autre système défini est utilisé, il doit être quantitatif et de sensibilité et fiabilité démontrées. Chaque appareil doit être éprouvé afin d'en assurer la fiabilité au cours du temps et l'équivalence. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Il faut prendre en considération d'inclure des essais plus spécialisés des fonctions sensorielles, motrices, d'apprentissage et de mémoire si d'autres données (par exemple, relations structure-activité, données épidémiologiques, autres études toxicologiques) indiquent que la substance est potentiellement neurotoxique. Le Document d'orientation sur les méthodes et stratégies d'essais en matière de neurotoxicité (7) contient de plus amples informations sur les essais spécialisés.

36. Des animaux qui montrent des signes de toxicité tels qu'une interférence avec les observations fonctionnelles est à craindre peuvent exceptionnellement être soustraits à ces observations. Une justification est demandé si des animaux sont éliminés des essais sur le fonctionnement.

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

37. Dans les études allant jusqu'à 90 jours, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. Il faut également mesurer la quantité de nourriture consommée (ou d'eau consommée, lorsque la substance est administrée par cette voie), au moins une fois par semaine. Dans les études à long terme, tous les animaux sont pesés au moins une fois par semaine pendant les premières treize semaines et ensuite au moins une fois toutes les quatre semaines. Il faut mesurer la quantité de nourriture consommée (ou d'eau consommée, lorsque la substance est administrée par cette voie) au moins une fois par semaine pendant les premières treize semaines et ensuite à des intervalles d'à peu près trois mois, sauf indication contraire liée à l'état général ou des diminutions de poids corporel.

Ophtalmologie

38. Dans les études de plus de 28 jours, un examen ophthalmologique à l'aide d'un ophthalmoscope ou d'un autre appareil approprié doit être fait avant l'administration de la substance et au terme de l'étude. De préférence tous les animaux et certainement les animaux du groupe ayant reçu la forte dose seront soumis a cet examen. Si des altérations sont détectées dans les yeux, ou si des signes cliniques y incitent, l'examen est étendu à tous les animaux. Dans les études à long terme un examen ophthalmologique à treize semaines est prévu. Des examens ophthalmologiques ne sont

pas nécessaires si les informations en la matière sont disponibles à partir d'autres études de durée comparable et utilisant des doses comparables.

Hématologie et biochimie clinique

39. Lorsque l'étude de neurotoxicité est conduite en combinaison avec une étude de toxicité systémique à dose répétée les examens hématologiques et les déterminations de biochimie clinique doivent être effectués comme il est stipulé dans la Ligne directrice de toxicité systématique à dose répétée. Les échantillons sont à prélever de telle façon que les effets possibles sur le comportement neurologique soient minimales.

Histopathologie

40. L'examen neuropathologique doit être conçu comme complément et extension des observations faites pendant la phase in vivo de l'étude. Des tissus d'au moins cinq animaux par sexe et par groupe (voir le Tableau 1 et le paragraphe 41) doivent être fixés in situ à l'aide de techniques de perfusion et fixation usuelles (voir le chapitre 5 de la référence 9 et le chapitre 50 de la référence 10). Tout changement important observable doit être consigné. S'il s'agit d'une étude indépendante, conduite pour dépister une neurotoxicité ou pour caractériser des effets neurotoxiques, les animaux restants peuvent soit être utilisés dans des procédures spécifiques de comportement neurologique (16)(17), névropathologiques (16)(17)(18)(19), neurochimiques (16)(17)(20)(21) ou électrophysiologiques, qui peuvent venir en complément des procédures et examens décrits ici, soit venir en augmentation du nombre d'animaux soumis à l'examen histopathologique. Ces procédures complémentaires sont particulièrement utiles lorsqu'il existe des indications d'un type spécifique ou d'une cible spécifique de neurotoxicité suite à des observations empiriques ou sur la base d'effets attendus (8)(9). Ces animaux restants peuvent également servir dans les évaluations pathologiques de routine qui sont décrites dans les Lignes directrices d'études à doses répétées.

41. Les échantillons de tissus sont colorés par une méthode usuelle, par exemple par de l'hématoxyline et de l'éosine, protégés par de la paraffine et examinés sous le microscope. Si de la neuropathie périphérique est observée ou escomptée, des échantillons de tissus de nerfs périphériques protégés par de la matière plastique sont examinés. Des signes cliniques peuvent également suggérer d'examiner d'autres sites (pour plus d'informations voir les références 9 et 10) ou d'utiliser d'autres méthodes de coloration. Des colorants spéciaux peuvent mettre en évidence des types spécifiques d'altérations pathologiques (24).

42. Des régions représentatives des systèmes nerveux central et périphérique doivent être soumises à un examen histologique (voir le chapitre 5 de la référence 9 et le chapitre 50 de la référence 10). Les sites examinés doivent normalement comprendre : le cerveau antérieur, le centre des hémisphères cérébraux, comprenant une coupe de l'hippocampe, le cerveau central, le cervelet, la protubérance annulaire, le bulbe rachidien, l'oeil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière et les renflements cervicaux et lombaires, ganglions de la chaîne dorsale, fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au genou) et ramifications du nerf tibial aux muscles du mollet. Les sections de la moelle épinière doivent comprendre des coupes transversales et longitudinales. Il faut porter une attention particulière à la vascularité du système nerveux. Un échantillon de muscle squelettique, surtout du mollet, devrait également être examiné. Une attention particulière devrait être donnée aux régions à structure cellulaire et fibreuse des systèmes nerveux central et périphérique connues pour être particulièrement sujettes aux attaques neurotoxiques.

43. Des informations au sujet des genres d'altérations neuropathologiques qui sont typiquement liés aux expositions à une substance neurotoxique peuvent être trouvées dans les références 9 et 10. Il

est recommandé de procéder par étapes dans l'examen des échantillons de tissus en comparant d'abord des coupes du groupe ayant reçu la forte dose avec des coupes du groupe témoin. Si aucune différence n'est constatée entre ces deux groupes, une analyse plus approfondie n'est pas de mise. Si des altérations neuropathologiques apparaissent dans le groupe à forte dose, alors des échantillons de tous les tissus potentiellement affectés des groupes à dose intermédiaire et à dose faible doivent être successivement examinés.

44. Si, lors de ce premier examen, des altérations neuropathologiques sont mises en évidence, alors des coupes faites dans toutes les régions potentiellement affectées de tous les groupes dosés doivent être codées et examinées à l'aveuglette sans connaissance du code. La fréquence et la sévérité de chaque lésion sont consignées. Quand toutes les régions de tous les groupes ont été cotées, le code est cassé et une analyse statistique est faite afin de déterminer la relation dose-réponse. Il faut donner la description des différents degrés de sévérité de chaque lésion.

45. Les résultats doivent être évalués dans le contexte des observations fonctionnelles et de comportement et des résultats d'autres études de toxicité systémique de la substance.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

46. Il faut présenter les résultats relatifs à chaque individu. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux montrant pour chaque groupe d'essai ou groupe témoin, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts ou sacrifiés pour des raisons humanitaires au cours de l'essai, le moment de chaque décès ou sacrifice, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, une description de ces signes, y compris le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux montrant des lésions, le type de ces dernières et le pourcentage d'animaux affectés de chaque type de lésion.

47. Les résultats de l'étude doivent être évalués en termes de fréquences, gravité et corrélation des effets neuropathologiques et de comportement (le cas échéant, neurochimiques et électrophysiologiques) avec d'autres effets nocifs observés. Dans la mesure du possible, il faudrait évaluer les résultats au moyen d'une méthode statistique adéquate et généralement agréée. Les méthodes statistiques doivent être choisies au moment de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

48. Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après :

Substance à tester :

- nature physique (forme isomère, pureté et propriétés physico-chimiques y compris);
- données permettant son identification.

Véhicule (le cas échéant) :

- justification du choix du véhicule.

Animaux à tester :

- espèce et souche utilisées ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;

- source, conditions d'encagement, acclimatation alimentation, etc. ;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions de l'essai :

- description détaillée de la formulation de la substance à tester et/ou de la préparation des aliments, concentration atteinte, stabilité et homogénéité de la préparation ;
- précisions sur les doses administrées, le véhicule et son volume, forme physique du mélange administré ;
- précisions sur le mode d'administration de la substance à tester ;
- justification du choix des niveaux de dose ; justification du choix de la voie et de la durée d'exposition ;
- conversion de la concentration (en ppm) de la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson en dose (en mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant ;
- précisions sur la qualité des aliments et de l'eau.

Procédures d'observation et d'essais :

- précisions sur la répartition des animaux de chaque groupe entre les sous-groupes de perfusion ;
- précisions sur les systèmes de cotation et les critères utilisés dans chaque mesure des observations cliniques détaillées ;
- précisions sur les tests fonctionnels de la réactivité sensorielle à divers stimuli (par exemple stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs) ; précisions sur l'évaluation de la force de préhension ; précisions sur l'évaluation de l'activité motrice (des détails sur l'appareil automatisé de détection de l'activité y compris) ;
- précisions des examens ophthalmologiques et, le cas échéant, des examens hématologiques et des tests de biochimie clinique avec les niveaux de référence ;
- précisions sur les procédures spécifiques de comportement, neuropathologie, neurochimie et électrophysiologie.

Résultats :

- poids corporel/variations du poids corporel et poids au moment du sacrifice ;
- consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant ;
- informations sur les réactions de toxicité, par sexe et par niveau de dose, y compris les symptômes de toxicité ou la mortalité ;
- nature, gravité et durée (moment du début et suite observée) des observations cliniques détaillées(préciser si les effets sont réversibles ou non) ;
- description détaillée de tous les résultats des tests fonctionnels ;
- description détaillée de tous les résultats des essais sur le comportement, et des essais neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques, le cas échéant;
- poids corporel au moment du sacrifice et poids des organes ;
- résultats de l'autopsie ;
- données sur l'absorption et le métabolisme si elles sont disponibles ;
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Discussion des résultats :

- informations sur la relation dose-réponse ;
- le rapport entre tout autre effet toxique et une conclusion sur le potentiel neurotoxique de la substance ;
- le niveau sans effet nocif observé.

Conclusions :

- une appréciation de la neurotoxicité globale de la substance est encouragée.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Document d'orientation pour la mise au point des Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, 1993.

(2) OECD Summary Report of the *ad hoc* Meeting on Neurotoxicity Testing, held outside Washington, United States, March 1990.

(3) OECD Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity, OECD, Paris, 1992.

(4) U.S. Environmental Protection Agency Pesticide Assessment Guidelines (1991). Subdivision F. Hazard Evaluation : Human and Domestic Animals, Addendum 10. Neurotoxicity. Series 81, 82 and 83. EPA 540/09-91-123. PB 91-154617.

(5) United States Environmental Protection Agency (1992). Health Effects Testing Guidelines Subpart 6 - Neurotoxicity. 40 CFR 798. 6050-6400.

(6) OECD Report of the Meeting of the *ad hoc* OECD Working Group on Neurotoxicity, held in Ottawa, Canada, March 1995.

(7) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(8) Ligne Directrice de neurotoxicité au stade du développement, Linge directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. En préparation.

(9) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60 : Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.

(10) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

(11) Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(12) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(13) Moser V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery : Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(14) Meyer O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(15) Crofton K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments : Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(16) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(17) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(18) Broxup, B. (1991). Neuropathology as a Screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(19) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl. Toxicol., 18, 343-352.

(20) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(21) O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(22) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In : Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299-335.

(23) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In : Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

(24) Bancroft, J. D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tableau 1 : Nombres minimaux d'animaux par groupe requis lorsque l'étude de neurotoxicité est conduite séparément ou en combinaison avec d'autres études

	ÉTUDE DE NEUROTOXICITE CONDUITE COMME :			
	Etude séparée	**Etude combinée avec une étude sur 28 jours**	**Etude combinée avec une étude sur 90 jours**	**Etude combinée avec une étude de toxicité chronique**
Nombre total d'animaux par groupe	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	15 mâles et 15 femelles	25 mâles et 25 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les essais fonctionnels y compris les observations cliniques détaillées	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour la perfusion in situ et la neuro-histopathologie	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les observations de toxicité à dose répétée, subchroniques et chroniques, hématologie, biochimie clinique, histopathologie, etc., comme indiqué dans les lignes directrices concernées		5 mâles et 5 femelles	10* mâles et 10* femelles	20* mâles et 20* femelles
Observations complémentaires, le cas échéant	5 mâles et 5 femelles			

* Ce nombre comprend cinq animaux sélectionnés pour les essais fonctionnels et les observations cliniques détaillées faisant partie de l'étude de neurotoxicité.

Tableau 2 : Fréquence des observations cliniques et essais fonctionnels

Genre d'observation		Durée de l'étude			
		Etude aiguë	**28 jours**	**90 jours**	**Etude chronique**
Dans tous les animaux	**Condition générale**	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement
	Mortalité/morbidité	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour
Dans les animaux sélectionnés pour les observations fonctionnelles	**Observations cliniques détaillées**	- avant la première exposition - à moins de huit heures après le dosage au moment où l'effet est le plus prononcé - aux jours 7 et 14 après le dosage	- avant la première exposition - après cela une fois par semaine	- avant la première exposition - une fois pendant la première ou deuxième semaine d'exposition - après cela une fois par mois	- avant la première exposition - une fois à la fin de la première semaine d'exposition - après cela une fois tous les trois mois
	Essais fonctionnels	- avant la première exposition - à moins de huit heures après le dosage au moment où l'effet est le plus prononcé - aux jours 7 et 14 après le dosage	- avant la première exposition - pendant la quatrième semaine du traitement le plus près possible de la fin de la période d'exposition	- avant la première exposition - une fois pendant la première ou deuxième semaine d'exposition - après cela une fois par mois	- avant la première exposition - une fois à la fin du premier mois d'exposition - après cela une fois tous les trois mois

ANNEXE

DEFINITIONS

Effet nocif : une altération par rapport aux valeurs normales qui est due au traitement et qui diminue l'aptitude d'un organisme à survivre, se reproduire ou s'adapter à l'environnement.

Dose : la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids (g,mg) de substance d'essai ou en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg) ou en concentration dans le régime (ppm).

Dosage : un terme général qui comprend la dose, la fréquence et la durée de l'administration.

Neurotoxicité : une altération néfaste de la structure ou de la fonction du système nerveux qui est la conséquence d'une exposition à un agent chimique, biologique ou physique.

Agent neurotoxique : concerne tout agent chimique, biologique ou physique pouvant induire une neorotoxicité.

CSENO : (NOAEL en anglais) est un sigle pour la concentration maximale sans effet nocif observé, le niveau de dose le plus élevé pour lequel aucun effet nocif imputable au traitement n'est observé.