Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 425

Toxicité aiguë par voie orale: méthode de l'ajustement des doses

30 juin 2022

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

OCDE
DES POLITIQUES MEILLEURES POUR UNE VIE MEILLEURE

Adoptée :
3 octobre 2008
Corrigée :
30 juin 2022
(hébergement, parag. 17)

LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses

1. INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques ou de l'évolution des pratiques d'évaluation. Le concept de la méthode de l'ajustement des doses a été décrit la première fois par Dixon et Mood (1)(2)(3)(4). En 1985, Bruce a proposé d'appliquer la méthode de l'ajustement des doses à la détermination de la toxicité aiguë des produits chimiques (5). Il existe plusieurs variantes du mode opératoire de la méthode de l'ajustement des doses permettant d'estimer la DL50. La présente Ligne directrice repose sur la méthode de Bruce, telle qu'elle a été adoptée par l'ASTM en 1987 (6) et révisée en 1990. Une étude comparant les résultats obtenus avec la méthode de l'ajustement des doses, l'essai classique pour la détermination de la DL50 et la méthode de la dose prédéterminée (Ligne directrice de l'OCDE 420) a été publiée en 1995 (7). Depuis les premiers articles de Dixon et Mood, d'autres auteurs se sont penchés sur les meilleures conditions d'utilisation de cette méthode (8)(9)(10)(11) dans des publications relatives à la biométrie et à ses applications. À la suite des recommandations émises en 1999 au cours de plusieurs réunions d'experts, une nouvelle révision a été jugée opportune, car i) un accord international avait été conclu sur l'harmonisation des valeurs de seuil de DL50 utilisées dans la classification des substances chimiques, ii) l'essai sur des animaux d'un seul sexe (généralement des femelles) est désormais jugé suffisant dans la plupart des cas, et iii) pour que l'estimation d'une valeur ponctuelle soit significative, il est besoin d'évaluer les intervalles de confiance.

2. Le mode opératoire décrit dans cette Ligne directrice concourt à ramener à un minimum le nombre d'animaux nécessaires pour estimer la toxicité orale aiguë d'un produit chimique. En plus de l'estimation de la DL50 et des intervalles de confiance, l'essai permet d'observer les signes de toxicité. La révision de la Ligne directrice 425 a été conduite en même temps que celles des Lignes directrices 420 et 423.

3. Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée à un objectif recherché sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (12). Ce document d'orientation contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la Ligne directrice 425.

4. Les définitions utilisées aux fins de la présente Ligne directrice figurent à l'Annexe 1.

© OCDE (2022)
L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation.

2. REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant de procéder à l'essai, le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo*, les données toxicologiques sur des analogues de structure ou des mélanges semblables et les usages prévus de la substance. Ces informations sont utiles pour apprécier la pertinence de l'essai quant à la protection de la santé humaine et de l'environnement et pour sélectionner la dose initiale appropriée.

6. La méthode permet d'estimer la DL50 avec un intervalle de confiance, et ses résultats autorisent le classement qualitatif et quantitatif de la substance dans le Système général harmonisé (SGH) de classification des produits chimiques entraînant une toxicité aiguë (16).

7. Si aucune donnée disponible ne permet d'effectuer une estimation préliminaire de la DL50 et de la pente de la courbe dose-effet, des simulations par ordinateur ont suggéré qu'on obtenait les meilleurs résultats avec une dose de départ d'environ 175 mg/kg et un espacement entre les doses d'une demi-unité logarithmique (soit un facteur de progression de 3,2). Il y a lieu de modifier cette dose initiale si la substance risque d'être très toxique. L'espacement d'une demi-unité logarithmique rend plus efficiente l'utilisation des animaux et augmente la précision de la prédiction de la DL50. Comme cette méthode tend à faire pencher l'estimation de la DL50 vers la dose initiale, il est essentiel de choisir une dose initiale inférieure à la DL50 estimée (se reporter au paragraphe 32 et à l'Annexe 2 pour l'analyse des séquences de doses et des valeurs initiales). Toutefois, en ce qui concerne les substances dont les effets sont très variables (fournissant des pentes faibles pour la courbe dose-effet), les estimations de la létalité peuvent encore être faussées et la DL50 sera entachée d'une erreur statistique importante, à l'instar de ce qui se produit avec d'autres méthodes d'étude de la toxicité aiguë. Afin d'y remédier, l'essai principal comporte une règle d'arrêt liée aux propriétés de l'estimation plutôt qu'un nombre fixe d'observations expérimentales (voir paragraphe 33).

8. Cette méthode s'applique le plus facilement aux substances entraînant la mort en l'espace d'un ou deux jours. Elle se prête mal aux cas où la mort est supposée survenir dans un délai nettement plus long (au moins cinq jours).

9. Les calculs animal-par-animal sont effectués par ordinateur, ce qui permet d'établir les séquences de l'essai et de fournir les estimations finales.

10. Il ne faut pas administrer les substances d'essai à des doses dont on sait qu'elles provoquent des douleurs ou souffrances très pénibles en raison de leurs propriétés corrosives ou très irritantes. Les animaux moribonds, ou dont les douleurs ou souffrances sont aiguës et prolongées, doivent être euthanasiés et considérés, dans l'interprétation des résultats, de la même manière que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et des indications sur les signes permettant de reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un document d'orientation séparé de l'OCDE (13).

11. Un essai limite offre un moyen efficace d'identifier les substances susceptibles d'être peu toxiques.

3. PRINCIPE DE L'ESSAI LIMITE

12. L'essai limite est un essai séquentiel réalisé sur cinq animaux au maximum. Une dose expérimentale de 2 000 mg/kg, voire dans des cas exceptionnels de 5 000 mg/kg, peut être appliquée. Les modes opératoires sont légèrement différents dans les deux cas (voir les paragraphes 23-25 pour l'essai limite à 2 000 mg/kg et les paragraphes 26-30 pour l'essai limite à 5 000 mg/kg). Le choix d'un plan d'essai

© OCDE 2022

séquentiel augmente la puissance statistique et vise aussi à faire pencher volontairement le mode opératoire vers le rejet de l'essai limite pour les substances ayant une DL50 proche de la dose limite, autrement dit à pécher par excès de sécurité. À l'instar de ce qui se produit avec n'importe quel essai limite, la probabilité de classer correctement une substance diminue à mesure que la DL50 réelle se rapproche de la dose limite.

4. PRINCIPE DE L'ESSAI PRINCIPAL

13. Dans cet essai, on applique une progression de doses uniques sur les animaux, un par un, à des intervalles d'au moins 48 heures. Le premier animal reçoit une dose qui se situe juste en dessous de la meilleure estimation de la DL50. Si l'animal survit, la dose administrée à l'animal suivant équivaut à la dose initiale multipliée par (un facteur) 3,2 ; s'il meurt, la dose de l'animal suivant est divisée par le même facteur (note : le facteur 3,2 est un facteur par défaut qui correspond à une progression de doses d'un demi-logarithme, le paragraphe 32 fournit des explications supplémentaires pour le choix du facteur de d'espacement des doses). Il convient d'observer chaque animal attentivement durant 48 heures au maximum avant de décider de poursuivre, et, le cas échéant, à quelle dose, le traitement sur le prochain animal. Cette décision est fondée sur la survivance pendant 48 heures de tous les animaux traités jusqu'à ce moment-là (les paragraphes 31 et 35 donnent des indications sur le choix de l'intervalle entre l'administration des doses). On applique une combinaison de critères d'arrêt pour limiter le nombre d'animaux utilisés pendant l'ajustement du dosage, afin d'atténuer les conséquences d'une dose initiale mal choisie ou d'une pente faible (voir paragraphe 34). On arrête d'administrer les doses dès qu'un de ces critères est satisfait (voir aux paragraphes 33 et 41) et, à ce moment-là, on estime la DL50 et l'intervalle de confiance pour l'essai, d'après l'état de tous les animaux au moment du sacrifice. Dans la plupart des cas, l'essai s'achève après que seulement quatre animaux ont été testés, à la suite de la première inversion du résultat. La DL50 est calculée selon la méthode de la probabilité maximale (14)(15) (voir paragraphes 41 et 43).

14. Les résultats de l'essai proprement dit servent de point de départ à la procédure de calcul de l'estimation de l'intervalle de confiance, lorsque cela est possible. La base du calcul de l'intervalle de confiance est exposée au paragraphe 45.

5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

5.1. Sélection des espèces animales

15. Le rongeur préféré est le rat, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. L'essai se pratique normalement sur des rats femelles (12). L'analyse des publications sur l'essai classique de détermination de la DL50 montre en effet que, bien que la différence de sensibilité entre les deux sexes soit généralement faible, dans les cas où l'on constate une différence, les femelles sont généralement un peu plus sensibles (7). Toutefois, si des propriétés toxicologiques ou toxicocinétiques d'analogues de structure indiquent que les mâles sont probablement plus sensibles, les femelles seront alors remplacées par des mâles. Si l'essai est conduit sur des mâles, ce choix sera dûment justifié.

16. On emploie de jeunes adultes sains appartenant à des souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début son traitement, chaque animal est âgé de 8 à 12 semaines et son poids est compris dans un intervalle de ± 20% du poids initial moyen des animaux éventuellement traités avant lui.

5.2. Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. La température du local expérimental est maintenue à 22 °C (± 3 °C). Idéalement le taux

© OCDE 2022

d'humidité relative devrait se situer entre 50 et 60%, mais il doit atteindre au moins 30% et, de préférence, ne pas dépasser 70%, sauf pendant le nettoyage du local. On dispense un éclairage artificiel faisant alterner des séquences de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Quarante-huit heures après le traitement, les animaux peuvent être retournés dans leur hébergement de groupe, à moins quíl y ait une raison de les héberger individuellement (par exemple s'il y a une inquiétude aue le contact avec d'autres animaux augmente le stress dû à la sévérité des signes climiques de toxicité). Cependant le temps que les animaux sont encagés individuellement devrait être réduit au minimum, comme il convient pour le bien-être animal. Ils peuvent être nourris avec des préparations classiques pour rongeurs de laboratoire et ont à disposition de l'eau potable ad libitum.

5.3. Préparation des animaux

18. Les animaux sont choisis au hasard, marqués individuellement à dessein d'identification et gardés dans leurs cages au moins cinq jours avant l'administration de la substance, afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Comme pour d'autres plans d'essais séquentiels, on s'assurera de disposer d'animaux de taille et de tranche d'âge appropriées pour toute la durée de l'essai.

5.4. Préparation des doses

19. En général, il faut administrer les substances d'essai dans un volume constant pour toute la gamme des doses à tester, en variant la concentration de la préparation administrée. Néanmoins, si le produit soumis à l'essai est un liquide ou un mélange, son administration sous forme non diluée, donc à concentration constante, peut être plus appropriée à l'évaluation ultérieure des risques de cette substance et certaines autorités chargées de la réglementation exigent qu'il en soit ainsi. La dose administrée ne peut en aucun cas dépasser le volume maximal. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Chez les rongeurs, le volume ne dépasse normalement pas 1 ml/100 g de poids corporel ; cependant, pour les solutions aqueuses, un volume de 2 ml/100 g de poids corporel est envisageable. S'agissant de la préparation de la solution à administrer, on préconise, de préférence, une solution ou suspension ou émulsion aqueuse, chaque fois que c'est possible, sinon, une solution ou suspension ou émulsion huileuse (par exemple dans de l'huile de maïs), et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule n'est pas aqueux, il faut connaître ses caractéristiques toxicologiques. Les doses doivent être préparées peu de temps avant l'administration, à moins que la stabilité de la préparation, sur la période précédant son utilisation, soit connue et acceptable.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Administration des doses

20. La substance d'essai est administrée par gavage en une seule dose à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Dans les rares cas où il est impossible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée et administrée sur une période ne dépassant pas 24 heures.

21. Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance : pour les rats, on supprime la nourriture, mais pas l'eau, à partir de la veille du jour de l'administration et pour les souris, on supprime la nourriture, mais pas l'eau, 3 à 4 heures avant l'administration. Après cette période de jeûne, les animaux sont pesés, puis la substance leur est administrée. La dose est calculée en fonction du poids corporel à jeun de chaque animal. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent continuer à être privés de nourriture, durant 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, selon la durée du traitement, d'alimenter les animaux et de leur donner à boire.

© OCDE 2022

6.2. Essai limite et essai principal

22. L'essai limite est surtout utilisé s'il existe des informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité se manifesterait à des doses supérieures à la dose limite réglementaire. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances, produits ou mélanges similaires, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des substances dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si cette substance risque d'être toxique, il faut procéder à l'essai proprement dit.

6.3. Essai limite

Essai limite à 2 000 mg/kg

23. La dose expérimentale est administrée à un animal. S'il meurt, on réalise l'essai principal afin de déterminer la DL50. Si l'animal survit, on traite quatre animaux supplémentaires suivant une séquence, de telle sorte qu'un total de cinq animaux soit testé. Cependant, si trois animaux meurent, l'essai limite s'achève et on entame l'essai principal. La DL50 est supérieure à 2 000 mg/kg si au moins trois animaux survivent. Si un animal meurt de façon inattendue à un moment tardif de l'étude, et si d'autres survivent, il convient d'arrêter le traitement et d'observer tous les animaux afin de voir si d'autres animaux vont également mourir au cours d'une période d'observation similaire (se reporter au paragraphe 31 pour la période d'observation initiale). Les morts tardives sont comptabilisées de la même façon que les autres morts. Les résultats sont notés comme suit : O = survie ; X = mort).

24. La DL50 est inférieure à la dose d'essai (2 000 mg/kg) si au moins trois animaux meurent.

O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

Si un troisième animal meurt, conduire l'essai principal.

25. Mettre cinq animaux à l'essai. La DL50 est supérieure à la dose d'essai (2 000 mg/kg) si au moins trois animaux survivent.

O OO OO
O OO XO
O OO OX
O OO XX
O XO XO
O XO OO/X
O OX XO
O OX OO/X
O XX OO

Essai limite à 5 000 mg/kg

26. Exceptionnellement, et seulement si cela se justifie par des exigences réglementaires particulières, l'utilisation d'une dose de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir l'Annexe 4). En raison des souffrances qu'ils infligent aux animaux, les essais dans la catégorie 5 du SGH (2 000-5 000 mg/kg) sont à éviter et ne doivent être envisagés que s'il est très probable que les résultats d'un tel essai présentent un intérêt direct pour la protection de la santé humaine ou animale ou de l'environnement.

© OCDE 2022

27. Administrer la dose d'essai à un animal. S'il meurt, mener l'essai principal afin de déterminer la DL50. Si l'animal survit, traiter deux animaux supplémentaires. Si les deux animaux survivent, la DL50 est supérieure à la dose limite et l'essai est terminé (à l'issue d'une période d'observation de 14 jours au cours de laquelle aucune dose supplémentaire n'a été administrée).

28. Si un ou deux animaux meurent, traiter deux autres animaux, un à la fois. Si un animal meurt de façon inattendue à un moment tardif de l'étude, et si d'autres survivent, il convient d'arrêter le traitement et d'observer tous les animaux afin de voir si d'autres animaux vont également mourir au cours d'une période d'observation similaire (se reporter au paragraphe 10 pour la période d'observation initiale). Les morts tardives sont comptabilisées de la même façon que les autres morts. Les résultats sont notés comme suit : O = survie, X = mort et I = inutile).

29. La DL50 est inférieure à la dose d'essai (5 000 mg/kg) si au moins trois animaux meurent.

O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

30. La DL50 est supérieure à la dose d'essai (5 000 mg/kg) si au moins trois animaux survivent.

O OO
O XO XO
O XO O
O OX XO
O OX O
O XX OO

6.4. Essai principal

31. Les animaux sont traités l'un après l'autre, généralement à des intervalles de 48 heures. Néanmoins, les intervalles entre l'administration des doses sont dictés par le moment de l'apparition, la durée et la gravité des effets toxiques. Le traitement d'un autre animal à la dose suivante devrait être retardé jusqu'au moment où la survie du dernier animal traité ne fait plus de doute. L'intervalle de temps peut être ajusté comme il convient, par exemple dans le cas d'un effet peu concluant. L'essai est plus facile à réaliser lorsqu'on fonde les décisions relatives à l'administration séquentielle sur un intervalle de temps unique. Il n'est cependant pas nécessaire de recalculer les doses ou les rapports de probabilité si les intervalles sont modifiés en cours d'essai. Le choix de la dose initiale s'opère à la lumière de toutes les informations disponibles (notamment des données sur les analogues de structure et les résultats de tous les autres essais de toxicité déjà pratiqués sur la substance d'essai) permettant d'estimer la DL50 et la pente de la courbe dose-effet.

32. Le premier animal reçoit une dose immédiatement inférieure à la meilleure estimation préliminaire de la DL50. Si l'animal survit, le deuxième animal reçoit une dose plus forte. Si le premier animal meurt ou paraît moribond, le deuxième animal reçoit une dose plus faible. Le facteur de progression entre les doses doit équivaloir à l'antilogarithme de 1/(la pente estimée de la courbe dose-effet) et demeurer constant tout au long de l'essai (une progression de 3,2 correspond à une pente de 2). À défaut d'informations sur la pente de la courbe de la substance d'essai, on applique un facteur de progression de 3,2. Avec ce facteur de progression par défaut, les doses sont choisies dans la séquence 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 2 000 (ou 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1 750, 5 000 pour répondre à certaines exigences réglementaires). Si aucune estimation de la létalité de la substance n'est disponible, le traitement débute par une dose de 175 mg/kg. Dans la plupart des cas, cette dose est sublétale et atténue de ce fait les douleurs et la souffrance des

© OCDE 2022

animaux. Si la tolérance des animaux à la substance est supposée être très variable (c'est-à-dire la pente de la courbe dose-effet est inférieure à 2,0), on envisagera d'augmenter le facteur de progression entre les doses au-delà de la valeur par défaut, à savoir 3,2, qui correspond à 0,5 sur une échelle logarithmique, avant de commencer l'essai. De la même façon, pour les substances ayant des pentes très fortes, on choisira des facteurs de progression inférieurs au facteur par défaut (l'Annexe 2 fournit un tableau de progressions des doses pour des pentes s'élevant à un nombre entier compris entre 1 et 8 et une dose de départ de 175 mg/kg).

33. L'administration des doses se poursuit en fonction des résultats obtenus sur tous les animaux traités jusqu'à ce moment-là, suivant une séquence d'intervalles fixes (par exemple 48 heures). L'essai prend fin dès qu'un des critères d'arrêt suivants est rempli :

a) trois animaux en série survivent à la dose la plus forte ;
b) cinq inversions de résultat se produisent dans une série de six animaux traités successivement ;
c) au moins 4 animaux ont suivi la première inversion et les rapports de probabilité spécifiés dépassent la valeur critique (voir au paragraphe 44 et à l'Annexe 3. Les calculs sont effectués à chaque animal traité, après le quatrième animal venant après la première inversion).

Pour une grande diversité de combinaisons de DL50 et de pentes, la règle d'arrêt (c) sera satisfaite avec 4 à 6 animaux après l'inversion du résultat. Dans le cas de certaines substances caractérisées par des courbes dose-effet dont la pente est presque nulle, on peut avoir besoin d'animaux supplémentaires, allant jusqu'à un total de quinze.

34. Lorsque les critères d'arrêt sont remplis, on estime la DL50 par un calcul d'après les résultats recueillis à la fin de l'essai, selon la méthode décrite aux paragraphes 40 et 41.

35. Les animaux euthanasiés en raison de leurs souffrances sont pris en compte de la même façon que les animaux morts au cours de l'essai. Si un animal meurt de façon inattendue à un moment tardif de l'étude, et si d'autres survivent à cette dose ou à une dose supérieure, il convient d'arrêter le traitement et d'observer tous les animaux afin de voir si d'autres animaux vont également mourir au cours d'une période d'observation similaire. Si les survivants subséquents meurent également *et* qu'il s'avère que toutes les doses dépassent la DL50, le mieux serait de recommencer l'étude avec une dose inférieure d'au moins deux crans à la plus petite dose ayant entraîné la mort (et d'allonger la période d'observation), étant donné que cette méthode offre une exactitude optimale lorsque la dose initiale est inférieure à la DL50. Si les animaux subséquents survivent à une dose supérieure ou égale à la dose à laquelle l'animal est mort, il n'est pas nécessaire de modifier la progression entre les doses, puisque l'information provenant de l'animal mort sera comptabilisée dans les calculs comme un décès à une dose inférieure à celle à laquelle ont été traités les survivants subséquents, ce qui aura pour effet d'abaisser la DL50.

7. OBSERVATIONS

36. Les animaux sont observés individuellement, au moins une fois au cours des 30 premières minutes suivant l'administration du produit et régulièrement durant les premières 24 heures (avec une attention particulière pendant les 4 premières heures), puis quotidiennement par la suite, la période d'observation totalisant 14 jours, à l'exception des animaux qui doivent être euthanasiés en raison de leurs souffrances et des animaux décédés au cours de l'étude. Toutefois la durée de la période d'observation ne doit pas être fixée de façon rigide. Elle sera fonction des effets toxiques, du moment de l'apparition des symptômes et de la longueur de la période de rétablissement, si bien qu'elle peut être prolongée suivant les besoins. Les moments auxquels apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, surtout si leur apparition a tendance à être retardée (17). Toutes les observations sont systématiquement consignées, de

© OCDE 2022

manière individuelle pour chaque animal.

37. Si les animaux continuent à manifester des signes de toxicité, des observations supplémentaires devront également porter sur des modifications de la peau et de la fourrure, les yeux et les muqueuses, les systèmes respiratoire et circulatoire, les systèmes nerveux central et autonome, l'activité somato-motrice et le comportement. Il faudra être attentif aux tremblements, aux convulsions, à la salivation, aux diarrhées, à la léthargie, au sommeil et au coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme (13) doivent être pris en considération. Les animaux moribonds et les animaux sujets à de fortes douleurs ou à une souffrance intense et prolongée doivent être euthanasiés. L'heure du décès des animaux morts spontanément ou euthanasiés en raison de leurs souffrances, doit être notée avec la plus grande précision possible.

7.1. Poids corporel

38. Le poids 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. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés, puis sacrifiés.

7.2. Pathologie

39. Tous les animaux (y compris ceux qui meurent au cours de l'essai ou sont retirés de l'étude pour être euthanasiés en raison de leurs souffrances) font l'objet d'une autopsie macroscopique. Tous les changements pathologiques macroscopiques relevés sur chaque animal sont notés. En ce qui concerne les animaux ayant survécu au moins 24 heures à l'administration initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes pathologiques macroscopiques est également envisageable car il peut livrer des informations utiles.

8. RÉSULTATS ET RAPPORT

8.1. Résultats

40. Les résultats doivent être fournis pour chaque animal. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque dose d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité (17), le nombre d'animaux morts au cours de l'essai ou euthanasiés à cause de leurs souffrances, l'heure de la mort de chaque animal, une description des effets toxiques, de leur évolution au cours du temps et de leur réversibilité, ainsi que le rapport d'autopsie. La dose de départ et la progression des doses doivent être justifiées, données pertinentes à l'appui.

8.2. Calcul de la DL50 pour l'essai principal

41. La DL50 est calculée selon la méthode de la probabilité maximale (14)(15), sauf dans les cas exceptionnels rapportés au paragraphe 42. Les précisions statistiques données ci-après peuvent être utiles aux calculs de la probabilité maximale proposés (avec une valeur de σ supposée). Toutes les morts, qu'elles soient immédiates, différées ou résultant d'une euthanasie, sont prises en compte dans l'analyse de la probabilité maximale. D'après Dixon (4), la fonction de probabilité s'écrit en ces termes :

$L = L_1 L_2 ..... L_n$

où

© OCDE 2022

L est la probabilité du résultat expérimental, étant donné μ et σ et n, le nombre total d'animaux soumis à l'essai.

$L_i = 1 - F(Z_i)$ si le i^{ème} animal a survécu, ou
$L_i = F(Z_i)$ si le i^{ème} animal est mort

où

F = distribution cumulée normale type
$Z_i = [\log(d_i) - \mu]/\sigma$
d_i = dose administrée au i^{ème} animal, et
σ = écart-type en unités logarithmiques de dose (ce qui n'est pas le logarithme de l'écart-type).

Une estimation de la valeur réelle de la DL50 est donnée par la valeur de μ qui maximise la probabilité L (voir paragraphe 43).

On estime que σ vaut 0,5, lorsqu'on ne dispose pas d'une meilleure valeur générique ou spécifique au cas.

42. Dans certaines circonstances, le calcul statistique est impossible ou risque de donner des résultats erronés. D'autres moyens, exposés ci-après, permettent alors d'estimer la DL50 :

1. Si l'essai a pris fin sur la base du critère a) du paragraphe 33 (c'est-à-dire qu'une dose limite a été testée de façon répétée), ou si la dose maximale a mis un terme à l'essai, la DL50 est considérée comme supérieure à la dose maximale et rapportée comme telle. La classification s'achève ainsi.
2. Si tous les animaux morts ont reçu des doses plus élevées que tous les animaux vivants (ou si tous les animaux vivants ont reçu des doses plus élevées que tous les animaux morts, bien que ce cas de figure soit très improbable), la DL50 se situe entre les doses administrées aux vivants et celles administrées aux animaux morts par la suite. Ces informations ne permettent pas de préciser davantage la valeur exacte de la DL50. Cependant, la probabilité maximale de la DL50 peut être estimée, si σ a une valeur. Le critère d'arrêt b) du paragraphe 33 décrit cette éventualité.
3. Si tous les animaux morts et tous les animaux vivants n'ont qu'une seule dose en commun et si tous les autres animaux morts ont reçu des doses supérieures et si tous les autres animaux vivants ont reçu des doses inférieures, ou vice versa, la DL50 est égale à leur dose commune. Lorsqu'une substance similaire est mise à l'essai, il faut choisir une progression de doses plus faible.

Si aucun des cas susmentionnés ne se produit, la DL50 est calculée selon la méthode de la probabilité maximale.

43. Le calcul de la probabilité maximale peut être effectué avec les progiciels SAS (14) (par exemple PROC NLIN) ou BMDP (15) (par exemple le programme AR), décrits à l'annexe 1D de la référence (3). D'autres logiciels peuvent également être utilisés. Les instructions concernant ces progiciels sont fournies dans les annexes à la norme ASTM E 1163-87 (6). [Le σ utilisé dans le programme BASIC abordé dans la référence (6) devra être adapté de façon à refléter les paramètres de la présente Ligne directrice 425]. Ces progiciels livrent une estimation du logarithme de la DL50 et de son écart-type.

44. La règle d'arrêt c) du paragraphe 33 basée sur les rapports de probabilité est fondée sur trois mesures de la progression de l'essai, qui revêtent la forme de la probabilité donnée au paragraphe 41 avec

© OCDE 2022

différentes valeurs de μ. Des comparaisons sont effectuées après chaque animal testé à la suite du sixième animal ne satisfaisant pas encore au critère a) ou b) du paragraphe 33. Les équations relatives au critère basé sur les rapports de probabilité figurent à l'Annexe 3. La manière la plus rapide de faire ces comparaisons consiste à procéder de façon automatique. Ces comparaisons peuvent être effectuées de façon répétée, par exemple à l'aide d'un tableur, tel que celui dont le mode d'emploi est également reproduit à l'Annexe 3. Si le critère est rempli, l'essai s'achève et la DL50 peut être calculée selon la méthode de la probabilité maximale.

8.3. Calcul de l'intervalle de confiance

45. À la suite de l'essai principal et du calcul de la valeur estimée de la DL50, il peut être possible d'estimer des intervalles de confiance pour la DL50. Tous ces intervalles de confiance fournissent une des informations précieuses sur la fiabilité et l'utilité de l'essai principal qui a été conduit. Un intervalle de confiance large indique que la DL50 estimée comporte une plus grande incertitude. La fiabilité de la DL50 estimée est faible et son utilité risque d'être limitée. Un intervalle de confiance étroit indique que la DL50 estimée comporte une petite incertitude. La DL50 estimée est fiable et d'une bonne utilité. Autrement dit, s'il fallait répéter l'essai principal, la nouvelle DL50 estimée devrait avoisiner la première DL50 estimée et ces deux estimations devraient avoisiner la DL50 réelle.

46. Suivant les résultats de l'essai principal, l'un des deux types d'estimations de l'intervalle de confiance de la DL50 réelle est calculé.

- Si au moins trois doses différentes ont été mises à l'essai et que la dose du milieu a laissé survivre au moins un animal et entraîné la mort d'un animal, on utilise une méthode de calcul fondée sur le profil de probabilité pour obtenir un intervalle de confiance censé contenir la DL50 dans 95% des cas. Toutefois, compte tenu du petit nombre d'animaux normalement utilisés, le niveau de confiance réel n'est généralement pas exact (18). La règle d'arrêt aléatoire améliore généralement la capacité de l'essai à répondre à différentes conditions sous-jacentes, mais elle induit aussi un léger écart entre le degré de confiance rapporté et le degré de confiance réel (19).
- Si tous les animaux survivent à ou en dessous d'une dose donnée et si tous les animaux meurent après avoir reçu la dose supérieure suivante, on calcule un intervalle dont la limite inférieure correspond à la plus forte dose à laquelle tous les animaux survivent et dont la limite supérieure correspond à la dose entraînant la mort de tous les animaux. Cet intervalle est qualifié d'«approximatif». Le degré de confiance exact associé à cet intervalle ne peut pas être déterminé spécifiquement. Néanmoins, ce type d'effet n'étant censé se produire que lorsque la courbe dose-effet a une pente forte, dans la plupart des cas, la DL50 réelle devrait se situer à l'intérieur de l'intervalle calculé ou en être très proche. Cet intervalle sera relativement étroit et suffisamment précis pour la majorité des applications pratiques.

47. Dans certains cas, les intervalles de confiance rapportés sont infinis, soit qu'ils incluent zéro à leur limite inférieure ou l'infini à leur limite supérieure, soit qu'ils incluent les deux. Ces intervalles peuvent apparaître si, par exemple, tous les animaux meurent ou tous les animaux survivent. La mise en oeuvre de cet ensemble de procédures nécessite des calculs spéciaux qui peuvent être soit effectués à l'aide d'un programme spécialisé disponible auprès de l'USEPA ou de l'OCDE, soit mis au point conformément aux instructions techniques fournies par l'USEPA ou l'OCDE (20). La couverture de ces intervalles et les caractéristiques du programme spécialisé sont décrits dans des rapports (21) également disponibles auprès de l'USEPA.

© OCDE 2022

8.4. Rapport d'essai

48. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques pertinentes (y compris l'isomérisation) ;
- données d'identification, notamment le numéro CAS.

Véhicule, le cas échéant :

- justification du choix du véhicule s'il est autre que l'eau.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée ;
- état microbiologique des animaux lorsqu'il est connu ;
- nombre, âge et sexe des animaux (y compris, le cas échéant, la justification du remplacement des femelles par des mâles) ;
- source, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions expérimentales

- justification de la sélection de la dose initiale, du facteur de progression entre les doses et des doses suivantes ;
- détails relatifs à la préparation de la substance d'essai, y compris l'état physique du produit administré ;
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai, notamment les volumes et les heures d'administration ;
- détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (type et source de nourriture et source de l'eau)

Résultats :

- poids corporel, modifications du poids corporel ;
- pour chaque animal, présentation sous forme de tableau des effets et de la dose administrée (animaux manifestant des signes de toxicité, y compris la nature, la gravité et la durée des effets ainsi que la mortalité) ;
- poids individuel des animaux le jour de l'administration, ensuite une fois par semaine et au moment de la mort ou du sacrifice ;
- moment de l'apparition et évolution dans le temps des signes de toxicité et réversibilité éventuelle de ces derniers pour chaque animal ;
- résultats de l'autopsie et observations histopathologiques pour chaque animal, s'ils sont disponibles ;
- données de DL50
- traitement statistique des résultats (description du sous-programme d'ordinateur et du tableur utilisé pour les calculs).

Analyse et interprétation des résultats.

Conclusions.

© OCDE 2022

9. BIBLIOGRAPHIE

4. Dixon W.J. and A.M. Mood. (1948). A Method for Obtaining and Analyzing Sensitivity Data. J. Amer. Statist. Assoc., 43, 109-126.
5. Dixon W.J. The Up-and-Down Method for Small Samples (1965). J. Amer. Statist. Assoc. 60, 967-978.
6. Dixon W.J. (1991). Staircase Bioassay: The Up-and-Down Method. Neurosci. Biobehav. Rev., 15, 47-50.
7. Dixon W.J. (1991) Design and Analysis of Quantal Dose-Response Experiments (with Emphasis on Staircase Designs). Dixon Statistical Associates, Los Angeles CA, USA.
8. Bruce R.D. (1985). An Up-and-Down Procedure for Acute Toxicity Testing. Fundam. Appl. Tox., 5, 151-157.
9. ASTM (1987). E 1163-87, Standard Test Method for Estimating Acute Oral Toxicity in Rats. American Society for Testing and Materials, Philadelphia Pa, USA.
10. 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 LD_{50} and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol., 33, 223-231.
11. Choi, S.C. (1990). Interval estimation of the LD50 based on an up-and-down experiment. Biometrics 46, 485-492.
12. Vågerö, M. and R. Sundberg. (1999). The distribution of the maximum likelihood estimator in up-and-down experiments for quantal dose-response data. J. Biopharmaceut. Statist. 9(3), 499-519.
13. Hsi, B.P. (1969). The multiple sample up-and-down method in bioassay. J. Amer. Statist. Assoc. 64, 147-162.
14. Noordwijk, A.J. van and J. van Noordwijk. (1988). An accurate method for estimating an approximate lethal dose with few animals, tested with a Monte Carlo procedure. Arch. Toxicol. 61, 333-343.
15. OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity . Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.
16. 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.
17. SAS Institute Inc. (1990). SAS/STAT® User's Guide. Version 6, Fourth Ed. or later. Cary, NC, USA.
18. BMDP Statistics Software, Inc. (1990). BMDP Statistical Software Manual. W.J. Dixon, Chief Ed. 1990 rev. or later. University of California Press, Berkeley, CA, USA.
19. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmentla Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals in

© OCDE 2022

November 1998, Part 2, pg 11. [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

20. Chan P.K. and Hayes A.W. (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.

21. Rosenberger, W.F., Flournoy, N. and Durham, S.D. (1997). Asymptotic normality of maximum likelihood estimators from multiparameter response-driven designs. Journal of Statistical Planning and Inference 60, 69-76.

22. Jennison, C. and Turnbull B.W. 2000. Group Sequential Methods with Application to Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, FL. USA.

23. Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Programme (AOT 425 StatPgm). Version: 1.0, 2001. [http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-524-nodirectorate-no-24-6775-8,FF.html]

24. Westat. 2001. Simulation Results from the AOT425StatPgm Program. Report prepared for U.S. E.P.A. under Contract 68-W7-0025, Task Order 5-03.

© OCDE 2022

ANNEXE 1 : DÉFINITIONS

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

Mort différée : signifie qu'un animal ne meurt ni ne paraît moribond dans les 48 heures, mais décède ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose : quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée par son poids (en g ou mg) ou en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

Facteur de progression entre les doses : parfois appelé facteur d'espacement des doses, c'est le facteur par lequel une dose est multipliée (progression de doses) si un animal survit, ou divisée si un animal meurt. Il est recommandé de choisir un facteur de progression de doses égal à l'antilogarithme de 1/(la pente estimée de la courbe dose-effet). Le facteur de progression par défaut préconisé est de 3,2 = antilogarithme de 0,5 = antilogarithme de 1/2.

SGH (Système général harmonisé de classification de substances chimiques et mélanges) : une activité menée conjointement par l'OCDE (santé humaine et environnement), le Comité d'experts du transport des marchandises dangereuses des Nations Unies (propriétés physico-chimiques) et l'OIT (communication des dangers) et coordonnée par le Programme interorganisations pour la gestion rationnelle des produits chimiques (IOMC).

Mort imminente : qualifie une situation où l'on s'attend à ce qu'un animal devienne moribond ou meure avant le prochain moment d'observation prévu. Les signes annonciateurs de cet état chez les rongeurs peuvent être des convulsions, la position latérale, la position couchée et des tremblements (voir le document d'orientation sur les effets sur l'homme (13) pour de plus amples détails).

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

Dose limite : correspond à la dose maximale pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond : état d'un animal mourant ou incapable de survivre, même s'il est traité (voir le document d'orientation sur les effets sur l'homme (13) pour de plus amples détails).

Taille nominale de l'échantillon : désigne le nombre total d'animaux mis à l'essai, diminué par le nombre d'animaux ayant une réaction identique au début de la série moins un, ou diminué par le nombre d'animaux testés jusqu'à, mais sans la comprendre, la paire qui crée la première inversion. Ainsi, pour une série de résultats opposés X et O (où, par exemple, X signifierait «meurt dans les 48 heures» et O «survit») formant la séquence OOOXXOXO, le nombre total d'animaux mis à l'essai est de 8 (taille de l'échantillon au sens courant) et la taille nominale de l'échantillon est de 6. Dans l'exemple choisi, il y a quatre animaux après l'inversion. Il est important d'indiquer si un comptage effectué à un moment particulier de la Ligne directrice se rapporte à la taille nominale de l'échantillon ou au nombre total d'animaux testés. Par exemple, le nombre maximal d'animaux testés dans l'étude est de 15. Lorsqu'il est mis fin à l'essai parce que ce nombre maximal est atteint, la taille nominale de l'échantillon sera inférieure ou égale à 15. Le premier membre de l'échantillon nominal est le $(r-1)^{ème}$ animal (le premier animal de la paire qui crée l'inversion) (voir inversion ci-après).

© OCDE 2022

Mort prévisible : situation caractérisée par des signes cliniques indiquant que la mort va survenir à un moment connu avant la fin projetée de l'expérience, par exemple l'incapacité d'atteindre l'eau ou la nourriture (voir le document d'orientation sur les effets sur l'homme (13) pour de plus amples détails).

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

Inversion : qualifie le phénomène dans lequel une réaction négative observée à une certaine dose est suivie par une réaction positive à la dose suivante testée ou vice versa (réaction positive suivie par une réaction négative). L'inversion est donc créée par une paire de réaction. Les animaux composant la première de ces paires sont numérotés r-1 et r.

Sigma (σ) : écart-type d'une courbe log-normale décrivant la gamme des tolérances des animaux à la substance d'essai (le sujet étant supposé réagir lorsque la dose dépasse sa tolérance). La valeur estimée de σ traduit une estimation de la variation des réactions manifestées par les animaux d'expérience à une gamme complète de doses. Voir pente et probit.

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

Règle d'arrêt : désigne ici aussi bien 1) un critère d'arrêt spécifique que 2) l'ensemble des critères dictant la fin d'une séquence de traitements. En particulier, pour l'essai principal, le terme «règle d'arrêt» employé au paragraphe 7 se réfère en fait au critère basé sur la comparaison des rapports de probabilité avec une valeur critique.

© OCDE 2022

ANNEXE 2. MÉTHODE DE DOSAGE

Séquence de doses dans l'essai principal

1. Mode opératoire de l'ajustement des doses. Dans chaque essai, les animaux sont traités, un par un, généralement à des intervalles de 48 heures. Le premier animal reçoit une dose immédiatement inférieure à la meilleure estimation de la DL50. Par ce choix, on corrige la tendance de la méthode **à faire pencher** l'estimation finale de la **DL50 vers** la dose initiale (voir paragraphe 7). L'allure générale des résultats devrait se stabiliser à mesure que le dosage est ajusté pour chaque animal suivant. Le paragraphe 3 ci-dessous fournit des indications supplémentaires pour le choix du facteur d'espacement entre les doses.

2. Progression des doses par défaut. Une fois que la dose de départ et le facteur d'espacement entre les doses ont été arrêtés, le toxicologue doit dresser la liste de toutes les doses possibles, y compris la dose maximale (2 000 ou 5 000 mg/kg). Les doses proches de la dose maximale doivent être éliminées de la progression. La nature séquentielle de la conception de la Ligne directrice 425 entraîne que les quelques premières doses fonctionnent comme une séquence s'ajustant d'elle-même. Compte tenu de la tendance de cette méthode à favoriser les valeurs positives, il est recommandé, lorsqu'on ignore tout de la substance, d'utiliser une dose initiale de 175 mg/kg. Si l'on applique la procédure par défaut dans l'essai principal, le traitement débutera à 175 mg/kg et les doses seront espacées d'un facteur de 0,5 sur l'échelle logarithmique des doses. Les doses à administrer sont les suivantes : 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, et 2 000 ou, pour répondre à certaines exigences réglementaires, 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1 750 et 5 000. Pour certaines substances très toxiques, il peut être nécessaire de prolonger la séquence des doses vers des valeurs plus basses.

3. Lorsqu'il paraît souhaitable d'appliquer un facteur de progression différent du facteur par défaut, il est utile de consulter le tableau 1 qui reproduit des progressions de doses pour des pentes (en nombres entiers) de 1 à 8.

Tableau 1. Progression de doses pour la Ligne directrice 425 de l'OCDE

Choisissez une pente et suivez la colonne. Toutes les doses sont données en mg/kg de poids corporel

Pente =	1	2	3	4	5	6	7	8
	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*	0,175*
							0,24	0,23
					0,275	0,26		
				0,31			0,34	0,31
			0,375			0,375		
								0,41
					0,44		0,47	
		0,55		0,55		0,55		0,55
					0,69		0,65	
								0,73
			0,81			0,82		

© OCDE 2022

				0,99			0,91	0,97
					1,09	1,2		
							1,26	1,29
	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
							2,4	2,3
					2,75	2,6		
				3,1			3,4	3,1
			3,75			3,75		
					4,4			4,1
							4,7	
		5,5		5,5		5,5		5,5
					6,9		6,5	
								7,3
			8,1			8,2		
				9,9			9,1	9,7
					10,9	12		
							12,6	12,9
	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
							24	23
					27,5	26		
				31			34	31
Pente =	1	2	3	4	5	6	7	8
			37,5			37,5		
					44			41
							47	
		55		55		55		55
							65	
					69			73
			81			82		
				99			91	97
					109	120		
							126	129
	175	175	175	175	175	175	175	175
							240	230
					275	260		
				310			340	310

© OCDE 2022

			375			375		
					440			410
							470	
		550		550		550		550
							650	
					690			730
			810			820		
				990			910	970
					1090	1200		
							1260	1290
	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
							2400	2300
					2750	2600		
				3100				3100
						3750	3400	
								4100
	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

Note : Si des doses inférieures sont nécessaires, extrapolez la progression vers des valeurs plus basses

© OCDE 2022

ANNEXE 3.

CALCULS POUR LA RÈGLE D'ARRÊT FONDÉE SUR LES RAPPORTS DE PROBABILITÉ

1. Comme cela a déjà été stipulé au paragraphe 33 de cette Ligne directrice, l'essai principal peut s'achever dès que le premier des trois critères d'arrêt est rempli. Dans tous les cas, même si aucun critère d'arrêt n'est satisfait, on arrêtera l'administration des doses après que 15 animaux ont reçu une dose. Les tableaux 2 à 5 fournissent des exemples d'essais conduits en l'absence d'informations sur la substance d'essai et, par conséquent, dans lesquels la dose initiale par défaut, 1,75 mg/kg, et le facteur de progression des doses par défaut, 3,2, soit l'antilogarithme de 0,5, ont été utilisés. Notons que la présentation de ces tableaux est seulement indicative.

2. Le tableau 2 montre comment l'essai principal prendrait fin si 3 animaux survivaient à la dose limite de 2 000 mg/kg ; le tableau 3 montre une situation analogue pour une dose limite de 5 000 mg/kg. (Ces tableaux illustrent des situations où l'essai limite n'a pas été jugé approprié a priori.) Le tableau 4 montre comment une séquence particulière de 5 inversions sur 6 animaux traités peut mettre fin à l'essai. Enfin, le tableau 5 montre un essai où le critère c) doit également être évalué, étant donné que ni le critère a) ni le critère b) n'ont été remplis et qu'une inversion de résultat a été suivie par le traitement de 4 animaux.

3. Le critère c) veut que l'on vérifie une règle d'arrêt fondée sur les rapports de probabilité après le traitement de chaque animal, et ce à partir du quatrième animal testé à la suite l'inversion. Trois «mesures de la progression de l'essai» sont calculées. Techniquement, ces mesures de la progression sont des probabilités, comme cela a été recommandé pour l'estimation de la DL50 par la méthode de la probabilité maximale. Cette méthode est étroitement liée au calcul d'un intervalle de confiance par une méthode basée sur la probabilité.

4. La méthode s'appuie sur le fait que lorsque suffisamment de données ont été réunies, une estimation ponctuelle de la DL50 devrait être plus fortement étayée que les valeurs situées au-dessus et en dessous de l'estimation ponctuelle, le soutien statistique étant quantifié d'après la probabilité. D'où le calcul de trois valeurs de probabilité : une probabilité pour l'estimation ponctuelle de la DL50 (appelée, dans l'exemple, estimation brute ou estimation fondée sur la moyenne des doses), une probabilité pour une valeur inférieure à l'estimation ponctuelle et une probabilité pour une valeur supérieure à l'estimation ponctuelle. Plus précisément, on considère que la valeur inférieure est égale à l'estimation ponctuelle divisée par 2,5 et que la valeur supérieure est égale à la valeur ponctuelle multipliée par 2,5.

5. On compare les valeurs de la probabilité en calculant des rapports de probabilité, puis en vérifiant si ces rapports de probabilité (LR) dépassent une valeur critique. L'essai s'achève lorsque le rapport de probabilité pour l'estimation ponctuelle dépasse chacune des deux autres probabilités d'un facteur 2,5, cette valeur reflétant un soutien statistique relativement fort à l'estimation ponctuelle. On calcule donc deux rapports de probabilité, un rapport de la probabilité de l'estimation ponctuelle sur la probabilité de l'estimation ponctuelle divisée par 2,5 et un rapport de la probabilité de l'estimation ponctuelle sur la probabilité de l'estimation ponctuelle multipliée par 2,5.

6. Les calculs de la DL50 sont faciles à effectuer à l'aide de n'importe quel tableur équipé de fonctions de probabilité normales. Les calculs sont illustrés au tableau 5 de l'Annexe 3, structuré de manière à imiter l'utilisation d'un tableur. Les étapes du calcul sont illustrées à l'aide d'un exemple où la dose maximale est de 5 000 mg/kg, mais les étapes se déroulent de manière analogue lorsque la dose maximale est de 2 000 mg/kg. Il est également possible d'utiliser un logiciel, directement téléchargeable à partir des sites

© OCDE 2022

Web de l'OCDE et de l'USEPA, qui fournit des tableaux comportant des cases pour la saisie des résultats sur les animaux et programmés avec les formules nécessaires à l'estimation de la DL50 et des intervalles de confiance. Le tableau 6 reproduit l'image sur écran d'une feuille de calcul produite par ce logiciel.

Exemple hypothétique avec une dose maximale de 5 000 mg/kg (tableau 5)

7. Dans l'exemple hypothétique basé sur une dose maximale de 5 000 mg/kg, le critère d'arrêt fondé sur les rapports de probabilité a été satisfait après la mise à l'essai de neuf animaux. La première inversion s'est produite avec le troisième animal testé. Le critère d'arrêt fondé sur les rapports de probabilité est vérifié lorsque quatre animaux ont été testés après l'inversion. Dans cet exemple, le quatrième animal testé après l'inversion est en fait le septième animal traité dans l'essai. Aussi, dans cet exemple, les calculs ne sont nécessaires qu'après l'essai du septième animal et les données peuvent être introduites à ce moment-là dans la feuille de calcul. Ensuite le critère d'arrêt fondé sur les rapports de probabilité devrait être vérifié après la mise à l'épreuve du septième, du huitième et du neuvième animal. Dans cet exemple, ce critère est rempli pour la première fois après l'essai du neuvième animal.

A. Introduire les valeurs de dose-effet pour chaque animal

Colonne 1. Les étapes sont numérotées de 1 à 15. Un maximum de 15 animaux peuvent être testés.
Colonne 2. Inscrire un I dans cette colonne pour chaque animal testé.
Colonne 3. Inscrire la dose reçue par le $i^{ème}$ animal.
Colonne 4. Inscrire un X si l'animal a réagi et un O si l'animal n'a pas réagi.

B. Tailles nominale et réelle de l'échantillon

8. La taille nominale de l'échantillon est constituée par les deux animaux qui forment la première inversion (ici, le deuxième et le troisième animal), plus tous les animaux testés ensuite. Ici, la Colonne 5 indique si un animal donné est inclus ou pas dans l'échantillon nominal.

La taille nominale de l'échantillon (*n* nominal) figure à la 16ème ligne. Il s'agit du nombre d'animaux dans l'échantillon nominal. Dans cet exemple *n* nominal est égal à 8.
Le nombre total d'animaux réellement testés est mentionné à la 17ème ligne.

C. Estimation brute de la DL50

9. La moyenne géométrique des doses administrées aux animaux de l'échantillon nominal donne une estimation brute de la DL50 à partir de laquelle la progression de l'essai peut être mesurée. Dans le tableau, elle est appelée «estimation fondée sur la moyenne des doses» et actualisée à chaque animal testé. Cette moyenne est limitée à l'échantillon nominal, afin de tenir compte d'un mauvais choix de la dose initiale qui pourrait engendrer une séquence initiale de réactions ou une séquence initiale d'absence de réaction (cependant, les résultats livrés par tous les animaux entrent dans le calcul des probabilités pour le calcul de la DL50 finale exposé ci-après). Rappelons que la moyenne géométrique de n nombres est le produit de n nombres élevé à la puissance 1/n.

L'estimation fondée sur la moyenne des doses apparaît à la Ligne 18 (par exemple $(175*550*...*1\,750)^{1/8} = 1\,292{,}78$)

La Ligne 19 donne le logarithme décimal de la valeur mentionnée à la Ligne 18 (par exemple, $\log_{10}1292{,}8 = 3{,}112$)

© OCDE 2022

D. Probabilité de l'estimation brute de la DL50

10. La probabilité est une mesure statistique qui indique à quel point la valeur estimée d'un paramètre, tel que la DL50, est étayée par les données. Des rapports de probabilités peuvent être utilisés pour comparer la mesure dans laquelle différentes estimations de la DL50 sont étayées par les données.

11. Calculer dans la Colonne 8 la probabilité de l'estimation brute de la DL50 pratiquée à l'étape C. La probabilité (Ligne 21) est le produit des contributions à la probabilité de chaque animal (voir paragraphe 41 du texte de la Ligne directrice). La contribution du i^{ème} animal à la probabilité est notée L_i.

12. Reporter dans la Colonne 7 l'estimation de la probabilité notée P_i de réaction à la dose d_i,. P_i est calculée à partir de la courbe dose-effet. Notons que les paramètres d'une courbe dose-effet probit sont la pente et la DL50 et qu'il faut donc assigner des valeurs à ces paramètres. Pour la DL50, on utilise l'estimation fondée sur la moyenne des doses mentionnée à la Ligne 18. En ce qui concerne la pente, on applique dans cet exemple la valeur par défaut, à savoir 2. La probabilité de réaction, P_i , peut être calculée suivant les étapes ci-dessous.

1. Calculer le logarithme décimal de la dose d_i (Colonne 6).

2. Pour chaque animal, calculer le score z, noté Z_i (ne figurant pas dans le tableau), en appliquant les formules :

σ = 1/pente
$Z_i = (\log_{10}(d_i) - \log_{10}(\text{DL50})) / \sigma$

Par exemple, pour le premier animal (Ligne 1),
$\sigma = 1/2$
$Z_1 = (2{,}243 - 3{,}112) / 0{,}500 = -1{,}738$

3. Pour la i^{ème} dose, la probabilité estimée de réaction est égale à

$P_i = F(Z_i)$

où F représente la fonction de distribution cumulée pour la distribution normale type (c'est-à-dire la distribution normale dans laquelle la moyenne est égale à 0 et la variance à 1).

Par exemple (Ligne 1),

$P_1 = F(-1{,}738) = 0{,}0412$

La fonction F (ou quelque chose de très proche) représente généralement la distribution normale dans les tableaux statistiques, mais cette fonction figure aussi souvent parmi les fonctions des feuilles de calcul, et ce sous différents noms, par exemple la fonction @NORMAL sur Lotus 1-2-3 (1) et la fonction @NORMDIST sur Excel (2). Il est possible de vérifier, à l'aide de valeurs courantes, telles que F(1,96) ≈ 0, 975 ou F(1,64) ≈ 0,95, si l'on a utilisé correctement la fonction du logiciel.

13. Colonne 8. Calculer le logarithme népérien de la contribution à la probabilité ($\ln(L_i)$). L_i est simplement la probabilité de réaction qui a réellement été observée sur le i^{ème} animal :

animaux ayant réagi : $\ln(L_i) = \ln (P_i)$
animaux n'ayant pas réagi : $\ln(L_i) = \ln (1 - P_i)$

© OCDE 2022

Notons que le logarithme utilisé ici est le logarithme népérien, contrairement aux autres étapes qui font appel au logarithme décimal. Ces choix sont dictés par ce que l'on attend généralement dans un contexte donné.

Les étapes décrites ci-dessus sont répétées pour chaque animal. Finalement :

Ligne 20 : additionner les logarithmes des contributions à la probabilité de la Colonne 8.
Ligne 21 : calculer la probabilité en appliquant la fonction exponentielle à la valeur logarithmique obtenue à la ligne 20.

Ainsi, par exemple, exp (-3,389) = $e^{-3,389}$ = 0,0337

E. Calculer les probabilités pour deux valeurs de doses, l'une supérieure et l'autre inférieure à l'estimation brute

14. Si les données autorisent une estimation précise, la probabilité devrait être élevée si l'estimation est une estimation raisonnable de la DL50, par rapport aux probabilités des valeurs éloignées de cette estimation. Comparer la probabilité de l'estimation basée sur la moyenne des doses (1292,8, ligne 18) aux valeurs différentes d'un facteur 2,5 de cette valeur (à savoir, 1292,8*2,5 et 1292,8/2,5). Les calculs exposés dans les Colonnes 9 à 12 sont effectués de la même manière que ceux décrits plus haut, si ce n'est que les valeurs 517,1 (= 1292,8/2,5) et 3232,0 (=1292,8*2,5) ont été utilisées pour la DL50, à la place de la valeur 1292,8. Les probabilités et leurs logarithmes sont mentionnés aux lignes 20 et 21.

F. Calculer les rapports de probabilité

15. Deux rapports de probabilité (Ligne 22) sont calculés à partir des trois valeurs de probabilité (Ligne 21). Le rapport de probabilité sert à comparer le soutien statistique à l'estimation s'élevant à 1292,8 au soutien statistique à chacune des deux autres valeurs, à savoir 517,1 et 3232,0. Les deux rapports de probabilité sont donc :

LR1 = [probabilité attribuée à la valeur 1292,8]/[probabilité attribuée à 517,1]
= 0,0337/0,0080
= 4,21

et

LR2 = [probabilité attribuée à la valeur 1292,8]/[probabilité attribuée à 3232,0]
= 0,0337/0,0098
= 3,44

G. Vérifier si les rapports de probabilité dépassent la valeur critique

16. Des rapports de probabilité élevés traduisent un soutien relativement élevé à l'estimation ponctuelle de la DL50. Les deux rapports de probabilité calculés à l'étape F (4,21 et 3,44) dépassent la valeur critique du rapport de probabilité, à savoir 2,5. Par conséquent, le critère d'arrêt fondé sur les rapports de probabilité est satisfait et l'essai s'achève là. C'est signalé par la mention "VRAI" dans la Ligne 24 et par une petite note en haut du tableau (exemple) indiquant que le critère fondé sur les rapports de probabilité a été rempli.

© OCDE 2022

10. BIBLIOGRAPHIE

Lotus Development Corporation (1999). Lotus® 1-2-3. Version 9.5, Millenium Edition. Cambridge, MA, USA.

Microsoft Corporation (1985-1997). Microsoft® Excel Version 5.0 or later. Seattle, WA, USA.

© OCDE 2022

Tableau 2. Exemple de critère d'arrêt (a) en appliquant la dose maximale de 2 000 mg/kg

Table 2. Example of stopping criterion (a) using 2000 mg/kg.

Stop after animal #5 because 3 animals survive at limit of 2000 mg/kg (#3-#5).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Step	(I)nclude; (E)xclude	Dose	(X)response (O)non-resp. OK	Included in nominal *n*	log10 Dose	LD50 = Prob. of response	#DIV/0! likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	#DIV/0! likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	#DIV/0! likelihood contribn. (ln *Li*)
1	I	175	O	no	2.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	O	no	2.7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	2000	O	no	3.3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	2000	O	no	3.3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	2000	O	no	3.3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	E				-						
7	E				-						
8	E				-	-	-	-	-	-	-
9	E				-	-	-	-	-	-	-
10	E				-	-	-	-	-	-	-
11	E				-	-	-	-	-	-	-
12	E				-	-	-	-	-	-	-
13	E							-	-	-	-
14	E							-	-	-	-
15	E							-	-	-	-
Nominal Sample size =				0							
Actual number tested =				5							

Ignore all calculation cells. No reversal in direction of response.

Maximum Likelihood Calculations cannot be completed. LD50 is greater than 2000 mg/kg.

Calculated maximum likelihood estimate of LD50 = none

Tableau 3. Exemple de critère d'arrêt (a) en appliquant la dose maximale de 5 000 mg/kg

Table 3. Example of stopping criterion (a) using 5000 mg/kg.

Stop after animal #6 because 3 animals survive at limit of 5000 mg/kg (#4-#6).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Step	(I)nclude; (E)xclude	Dose	(X)response (O)non-resp. OK	Included in nominal *n*	log10 Dose	LD50 = Prob. of response	#DIV/0! likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	#DIV/0! likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	#DIV/0! likelihood contribn. (ln *Li*)
1	I	175	O	no	2.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	O	no	2.7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	1750	O	no	3.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	5000	O	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	5000	O	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	I	5000	O	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	E				-						
8	E				-						
9	E				-	-	-	-	-	-	-
10	E				-	-	-	-	-	-	-
11	E				-	-	-	-	-	-	-
12	E				-				-	-	-
13	E				-				-	-	-
14	E				-				-	-	-
15	E				-	-	-	-	-	-	-
Nominal Sample size =				0							
Actual number tested =				6							

Ignore all calculation cells. No reversal in direction of response.

Maximum Likelihood Calculations cannot be completed. LD50 is greater than 5000 mg/kg.

Calculated maximum likelihood estimate of LD50 = none

Tableau 4. Exemple de critère d'arrêt (b)

Table 4. Example of stopping criterion (b)

Stop after animal #7 because 5 reversals in 6 consecutive animals tested (#2-#7).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Step	(I)nclude; (E)xclude	Dose	(X)response (O)non-resp. OK	Included in nominal *n*	log10 Dose	LD50 = Prob. of response	31.0 likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	12.4 likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	77.6 likelihood contribn. (ln *Li*)
1	I	175	X	no	2.2430	0.9335	-0.0688	0.9892	-0.0108	0.7602	-0.2742
2	I	55	X	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607
3	I	17.5	O	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031
4	I	55	X	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607
5	I	17.5	O	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031
6	I	55	X	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607
7	I	17.5	O	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031
8	E				-	-	-	-	-	-	-
9	E				-	-	-	-	-	-	-
10	E				-	-	-	-	-	-	-
11	E				-	-	-	-	-	-	-
12	E				-	-	-	-	-	-	-
13	E				-	-	-	-	-	-	-
14	E				-	-	-	-	-	-	-
15	E				-	-	-	-	-	-	-
Nominal Sample size =				6							
Actual number tested =				7							
Dose-averaging estimator				31.02							
log10 =				1.492							
log-likelihood sums:							-2.2906		-3.2021		-3.4655
likelihoods:							0.1012		0.0407		0.0313
likelihood ratios:									2.4880		3.2378
Individual ratios exceed critical value?				critical=	2.5				FALSE		TRUE
Both ratios exceed critical value?									FALSE		
Calculated maximum likelihood estimate of LD50 =					29.6						

Automated calculation; not relevant to this case.

Final estimate obtained from Maximum Likelihood Calculations

Tableau 5. Exemple de critère d'arrêt (c)

Table 5. Example of stopping criterion (c)

Stop when LR criterion is first met, here at animal #9. Check LR criterion starting at animal #6.

Assumed slope	2	sigma =	0.5

Parameters of convergence criterion	
critical LR	2.5
factor of LD50	2.5

Result: The LR criterion is met

1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
Step	(I)nclude; (E)xclude	Dose	(X)response (O)non-resp. OK	Included in nominal *n*	log10 Dose	Contrib.to DAE	LD50 = Prob. of response	1292.8 likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	517.1 likelihood contribn. (ln *Li*)	LD50 = Prob. of response	3232.0 likelihood contribn. (ln *Li*)
1	I	175	O	no	2.2430	0.0000	0.0412	-0.0421	0.1733	-0.1903	0.0057	-0.0057
2	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
3	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
4	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
5	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
6	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
7	I	1750	O	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.9257	0.8552	-1.9323	0.2971	-0.3525
8	I	5000	X	yes	3.6990	3.6990	0.8800	-0.1279	0.9756	-0.0247	0.6477	-0.4344
9	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
10	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
11	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
12	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
13	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
14	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
15	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
Nominal Sample size =				8								
Actual number tested =				9								
Dose-averaging estimator				1292.78								
log10 =				3.112								
log-likelihood sums:								-3.3894		-4.8270		-4.6260
likelihoods:								0.0337		0.0080		0.0098
likelihood ratios:										4.2104		3.4436
Individual ratios exceed critical value?				critical=	2.5					TRUE		TRUE
Both ratios exceed critical value?										TRUE		
Calculated maximum likelihood estimate of LD50 =						1329.6						

Final estimate obtained from Maximum Likelihood Calculations

Tableau 6. Exemple de critère d'arrêt (c) sur la feuille de calcul du logiciel de l'OCDE pour la Ligne directrice 425

AOT425StatPgm

New Test Load Data Save Data Get Report Options About AOT425 Exit

Test / Substance: Example of stopping criterion in Paragraph 33 (c) of OECD TG 425

Test Type: Main

Limit Dose: 5000

Assumed values at start of the main test: LD50: Default Sigma: 0.5

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	1	175	0	0	
2	2	550	0	0	
3	3	1750	X	X	
4	4	550	0	0	
5	5	1750	X	X	
6	6	550	0	0	
7	7	1750	0	0	
8	8	5000	X	X	
9	9	1750	X	X	
10		Stop Dosing			
11					
12					
13					
14					
15					

The main test is complete.

Stopping criteria met: LR criterion.
Estimated LD50 = 1750 (The one dose with partial response). 95% PL Confidence interval is 651.9 to 2690.

ANNEXE 4.

CRITÈRES POUR CLASSER LES SUBSTANCES D'ESSAI DONT LA DL50 SUPPOSÉE EST SUPÉRIEURE À 2 000 MG/KG SANS AVOIR RECOURS À L'ESSAI

1. Les critères de la Catégorie 5 de dangers sont destinés à permettre l'identification de substances d'essai ayant une toxicité aiguë relativement faible mais susceptibles, sous certaines conditions, de présenter un danger pour des populations vulnérables. La DL50 de ces substances est supposée se situer entre 2 000 et 5 000 mg/kg par voie cutanée ou orale, ou à des doses équivalentes par d'autres voies d'administration. Les substances d'essai pourraient entrer dans la catégorie de danger définie par : 2 000 mg/kg<DL50<5 000 mg/kg (Catégorie 5 dans le SGH), dans les cas suivants :

a) si des données fiables attestent que la DL50 se situe dans l'intervalle de valeurs assigné à la Catégorie 5 ; ou si d'autres études menées sur des animaux ou des effets toxiques observés chez l'être humain indiquent que ces substances pourraient présenter un danger aigu pour la santé humaine.

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

- l'on possède des informations fiables montrant des effets toxiques sensibles chez l'être humain, ou
- si des cas de mortalité ont été observés lorsque la substance a été mise à l'essai jusqu'aux valeurs de la Catégorie 4 par voie orale, ou
- si un jugement d'expert confirme la présence de signes cliniques significatifs de toxicité, lorsque la substance est mise à l'essai à des valeurs allant jusqu'à celles de la Catégorie 4, à l'exception de la diarrhée, de l'horripilation et de l'aspect mal soigné, ou
- si un jugement d'expert confirme des informations fiables provenant d'autres études sur animaux montrant qu'un effet aigu sensible est possible.

ESSAI À DES DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 MG/KG

2. En raison des souffrances qu'ils infligent aux animaux, les essais dans la Catégorie 5 du SGH (2 000-5 000 mg/kg) sont à éviter et ne doivent être envisagés que s'il est très probable que les résultats d'un tel essai présentent un intérêt direct pour la protection de la santé humaine.