OECD/OCDE 452

Adoptée:
25 juin 2018

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

Études de toxicité chronique

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (LD) sont périodiquement revues à la lumière des progrès scientifiques, des nouvelles pratiques d'évaluation ainsi que de considérations relatives au bien-être animal. La LD 452 initiale a été adoptée en 1981. Sa révision a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4). La mise à jour de la LD 452 a été effectuée en parallèle avec la révision des LD 451 (études de cancérogenèse) et 453 (études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse), dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente Ligne directrice vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels.

2. La plupart des études de toxicité chronique étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente Ligne directrice est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, les principes et procédures décrits dans la présente Ligne directrice et dans la LD 409, Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs : 90 jours (5) pourront aussi être appliqués, moyennant des modifications appropriées, comme indiqué dans le Document d'orientation de l'OCDE No. 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (6).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques du produit chimique testé, et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le Document d'orientation No. 116 (6).

4. La présente Ligne directrice porte essentiellement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique. Bien que des études de toxicité chronique à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par

© OCDE (2018)

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

Selon la Décision du Conseil de déléguer son autorité pour les amendements à l'Annexe I de la Décision du Conseil sur l'Acceptation Mutuelle des Données dans l'évaluation des produits chimiques [C(2018)49], cette Ligne directrice a été approuvée par la Réunion Conjointe du Comité des Produits Chimiques et le Groupe de Travail sur les Produits Chimiques, les Pesticides et la Biotechnologie, par procédure écrite le 25 juin 2018.

inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente Ligne directrice, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou l'inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances par inhalation (6) (7) et par voie cutanée (6). Les LD 412 (8) et 413 (9), ainsi que le Document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (7), sont tout particulièrement consultés lors de la conception d'études à plus long terme portant sur une exposition par inhalation. La LD 410 (10) est consultée dans le cas d'un essai par voie cutanée.

5. L'étude de toxicité chronique donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée sur une portion considérable de la durée de vie des espèces employées. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance, et indiquera les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé, qui permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

6. Les objectifs des études couvertes par la présente Ligne directrice pour les essais sont les suivants:

- Identification de la toxicité chronique d'une substance ;
- Identification des organes cibles ;
- Caractérisation de la relation dose-effet ;
- Identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR) ;
- Prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine ;
- Obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (6).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Lors de l'évaluation des caractéristiques toxicologiques d'un produit chimique, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur le produit chimique testé avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel de toxicité chronique, et faire le moins possible appel aux animaux. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques du produit chimique testé; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats d'éventuelles études de toxicité *in vitro* ou *in vivo*; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données Q(SAR) disponibles et les données toxicologiques relatives aux substances structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les

© OCDE 2018

résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour les essais de toxicité chronique entrepris dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'un produit chimique particulier (11) (12) (13) (14).

8. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le Document d'orientation No. 116 (7) ainsi que dans le Document d'orientation No. 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (15).

9. Lors de la réalisation d'une étude de toxicité chronique, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le Document d'orientation No. 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (16). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit : « *Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration du produit chimique testé pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.* »

10. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le Document d'orientation No. 116 (6) ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (17) (18). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des objectifs principaux de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de dose appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (LD 453) est menée (paragraphe 11).

11. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (LD 453), plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (LD 452) et une étude de cancérogenèse (LD 451). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Toutefois, les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 9 et 20-25) sont respectés rigoureusement lors de la réalisation d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (LD 453); il est reconnu également que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

© OCDE 2018

12. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente Ligne directrice figurent dans le Document d'orientation No. 116 (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. Le produit chimique testé est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 33). Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois sont justifiées, surtout dans le cas de durées plus courtes. Le produit chimique testé est normalement administrée par voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peut aussi être appropriée. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être enrôlés (voir paragraphe 19). Au cours de la période d'administration, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

14. La présente Ligne directrice traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique chez les rongeurs (voir paragraphe 2), bien que certains régimes réglementaires puissent exiger la réalisation d'études similaires chez des non-rongeurs. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique avec des non-rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient être conformes aux principes décrits dans la présente Ligne directrice ainsi que dans la LD 409, Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs : 90 jours (5). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le Document d'orientation No. 116 (6).

15. Cette Ligne directrice se rapporte essentiellement au rat, mais d'autres espèces de rongeurs, comme la souris, peuvent être utilisées. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur courte durée de vie, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs, et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de toxicité chronique sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

16. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (19) (20) (21). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. La

© OCDE 2018

température du local des animaux d'expérience est de 22°C (± 3°C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire, avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée dans le cadre de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable du produit chimique testé, et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque le produit chimique testé est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

17. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours, et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale, et n'excède pas ±20% du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micro-puce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour qu'à la fin de l'étude, chaque groupe contienne un nombre de sujets permettant d'effectuer une évaluation statistique et biologique complète. Pour les rongeurs, il convient normalement d'employer au moins 20 animaux de chaque sexe à chaque niveau de dose, tandis que pour les non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe de dose pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis.

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

19. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude (au moins 10 animaux de chaque sexe par groupe), par exemple à 6 mois, afin de recueillir des données sur la progression des changements toxicologiques et des informations mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données,

© OCDE 2018

obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur le produit chimique testé, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Des groupes satellites peuvent également être constitués, afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par le produit chimique étudié. En général, ces investigations portent uniquement sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (22). Si des sacrifices en cours d'étude ou l'inclusion de groupes sentinelles ou satellites sont prévus, le nombre d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Ces animaux sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosage

20. Le Document d'orientation No. 116 (6), donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 27). Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance testée ou aux matières apparentées.

21. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques du produit chimique testé, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs présentés au paragraphe 22 ci-dessous, le niveau de dose le plus élevé est choisi pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %).

22. Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité; par exemple une dose entraînant un effet indésirable préoccupant, mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible. La dose maximale ne dépasse pas 1 000 mg/kg de poids corporel (dose limite, voir paragraphe 27).

23. Lors de la sélection des doses, le directeur de l'étude devra considérer au préalable et s'assurer que les données générées permettent de satisfaire les exigences réglementaires parmi les pays de l'OCDE, comme il convient (évaluation des dangers et des risques, classification et étiquetage, évaluation des perturbateurs endocriniens, par exemple).

24. Les niveaux de dose et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le

© OCDE 2018

niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.

25. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques du produit chimique testé, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente Ligne directrice, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation fait l'objet d'une justification.

26. Comme le précise le Document d'orientation No. 116 (6), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants :

- Non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse;
- Toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre des doses externes et internes surviennent ou non;
- Lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents;
- Aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.;
- Régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé;
- Prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

27. Le groupe témoin est un groupe non-traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration du produit chimique testé, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si le produit chimique testé est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

28. S'il est possible d'anticiper, en se basant sur les résultats d'études préliminaires, qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg poids corporel/jour, réalisé en suivant les procédures décrites pour la présente étude, ne produira probablement pas d'effets indésirables, et si la toxicité est improbable compte tenu des données disponibles sur les substances structurellement apparentées, on peut considérer qu'une étude complète à trois niveaux de dose n'est pas indispensable. Une limite de 1 000 mg/kg poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

Préparation des doses et administration du produit chimique testé

29. La substance à tester est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le Document d'orientation No. 116 (6).

© OCDE 2018

La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques du produit chimique testé, de sa biodisponibilité, ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

30. Si nécessaire, le produit chimique testé est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention du produit chimique testé; effets sur les propriétés chimiques du produit chimique testé susceptibles de modifier sa toxicité ; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer d'informations sur la stabilité du produit chimique testé et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

31. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration du produit chimique dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si le produit chimique testé est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

32. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne du produit chimique testé (à raison de sept jours par semaine), et ce normalement pendant une période de 12 mois (voir également le paragraphe 33) encore qu'une durée plus longue puisse être requise selon les prescriptions réglementaires. Tout autre régime de dosage, par exemple une administration cinq jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le précise la LD 410 (11), et ce pendant une période de 12 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées « nez seul », il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir également la LD 412 (8).

© OCDE 2018

33. Lorsque le produit chimique testé est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, le composé chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose quotidienne en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et ne dépasse pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (23). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permet d'éviter tout effet local sévère. Il convient d'éviter les concentrations d'essai susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

34. Bien que la présente Ligne directrice concerne principalement des essais de toxicité chronique d'une durée de 12 mois, le plan de l'étude permet une application de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par le produit chimique testé sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition. Le Document d'orientation No. 116 (6) fournit des indications supplémentaires, notamment en ce qui concerne la survie des animaux d'expérience.

OBSERVATIONS

35. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.

36. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs, et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment porter sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la

© OCDE 2018

présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (24).

37. Avant la première administration du produit chimique testé, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou de autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traités à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres données suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.

38. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (24) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (25) (26) (27), et une évaluation de la force de préhension (28) ainsi que de l'activité motrice (29) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.

39. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité nutritionnelle

40. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

Hématologie et biochimie clinique

41. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois), en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 18). Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.

© OCDE 2018

42. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance donnée. Si la substance exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent également être indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

43. Des analyses de biochimie clinique visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques, et en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang[1]. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (31) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (31). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction en fonction de la toxicité de la substance. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance donnée.

44. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux

[1] Pour un certain nombre de dosages effectués sur le sérum ou le plasma, et plus particulièrement pour le dosage du glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer des effets plus subtils ainsi que de rendre l'interprétation plus difficile. En revanche, le jeûne peut modifier le métabolisme général des animaux et, en particulier dans les études d'alimentation, perturber l'exposition quotidienne à le produit chimique testé. Tous les animaux sont évalués dans le même état physiologique, et il sera donc préférable de programmer les évaluations détaillées ou neurologiques pour un autre jour que celui des prélèvements de biochimie clinique.

© OCDE 2018

spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (30): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.

45. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il convient de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (30). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 50), il convient d'envisager d'en obtenir.

Pathologie

Autopsie macroscopique

46. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 19). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles peut devoir être effectuée au cas-par-cas, à la discrétion du directeur d'étude.

47. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 45. Les glandes surrénales, le cerveau, les épididymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation. Dans les études chez la souris, la pesée des glandes surrénales est facultative.

48. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (32) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif) :

© OCDE 2018

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	muscle squelettique	rein
aorte	glande coagulante	nerf périphérique	[sternum]
[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule
cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	œil (dont rétine)	thymus
cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage	thyroïde
cœur	glande salivaire	ovaire	trachée
col utérin	glande surrénale	pancréas	[uretère]
côlon	hypophyse	parathyroïde	[urètre]
[dents]	iléon	Peau	utérus (col inclus)
duodénum	jéjunum	poumon	vagin
épididyme	[langue]	prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)
estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	rate	vésicule séminale
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie urinaire
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues du produit chimique testé sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Pour les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des LD 412 (8) et 413 (9). Pour les autres organes et tissus (outre les tissus de l'appareil respiratoire spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

© OCDE 2018

Histopathologie

49. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (32). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants :

- Tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin;
- Tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude;
- Tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques;
- Tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses;
- Dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

50. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

51. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et porter sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

52. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 8). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

RAPPORT D'ESSAI

53. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai :

– état physique, pureté et propriétés physico-chimiques;
– données d'identification;
– provenance de la substance;
– numéro de lot;

© OCDE 2018

– certificat d'analyse chimique;

Véhicule (le cas échéant):

– justification du choix de véhicule (s'il est autre que l'eau);

Animaux d'expérience:

– espèce/souche utilisée et justification du choix opéré;
– nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai;
– provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;
– poids de chaque animal au début de l'essai;

Conditions expérimentales:

– justification de la voie d'administration et du choix des doses;
– le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données;
– détails concernant la formulation du produit chimique testé ou son incorporation dans les aliments;
– données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
– voie d'administration et détails concernant l'administration du produit chimique testé;
– pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier);
– doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration du produit chimique testé (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson;
– détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson;

Résultats (Les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal):

– données sur la survie;
– poids corporel/variations du poids corporel;
– prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant;
– réponse toxique par sexe et dose, y compris signes de toxicité;
– nature, incidence (et, si elle est évaluée, sévérité), et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes);
– examen ophtalmologique;
– examens hématologiques;
– épreuves de biochimie clinique;
– examens d'urine;
– résultats des recherches de neurotoxicité ou d'immunotoxicité;
– poids corporel à l'issue de l'essai ;
– poids des organes (et leur rapport au poids corporel, le cas échéant);

© OCDE 2018

- résultats d'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement;
- données relatives à l'absorption, le cas échéant;

Traitement statistiques des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment :

- relations dose-réponse;
- examen de toutes les informations concernant le mode d'action;
- examen de toutes les approches de modélisation;
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé);
- données de contrôle historiques;
- applicabilité des résultats à l'être humain;

Conclusions

© OCDE 2018

RÉFÉRENCES

1. OCDE (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, Direction de l'environnement, OCDE, Paris.
2. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32, 163-208.
3. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol*. 40, 145-191.
4. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 437-445.
5. OCDE (1998), *Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours*, Lignes Directrices No. 409, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
6. OCDE (2009), Draft Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies, Series on Testing and Assessment No. 116, disponible: www.oecd.org/env/testguidelines.
7. OCDE (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*. No.39 ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
8. OCDE (2009), *Toxicité à doses répétées par inhalation : étude sur 28 jours*, Ligne Directrice No. 412, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
9. OCDE (2009), *Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours*, Lignes Directrice No. 413, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
10. OCDE (1981), *Toxicité cutanée à doses répétées - étude à 21/28 jours*, Lignes Directrice No. 410, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
11. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 1-7.
12. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 9-35.
13. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 37-68.
14. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 69-98.
15. OCDE (2002), *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies*, Série sur les essais et évaluations No. 35 et Série sur les pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
16. OCDE (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*, Série sur les essais et évaluations No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
17. Rhomberg, LR, Baetcke, K, Blancato, J, Bus, J, Cohen, S, Conolly, R, Dixit R, Doe, J, Ekelman, K, Fenner-Crisp, P, Harvey, P, Hattis, D, Jacobs, A, Jacobson-Kram, D, Lewandowski, T, Liteplo, R, Pelkonen, O, Rice, J, Somers, D, Turturro, A, West, W, Olin, S. Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9) 729 - 837 (2007).

© OCDE 2018

18. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
19. Directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Journal officiel, 29, L358, 18 décembre 1986.
20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2. http://www.gv-solas.de/publ/heft1_1988.pdf
22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems. http://www.gv-solas.de/auss/hyg/hyg-p7_e.html
23. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23. Available at: http://www.ff.up.pt/farmacologia/pdf/good_practice_lab_animals.pdf
24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
25. Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp*., 40, 999-1003.
26. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol.Environ*. Health, 9, 691-704.
27. Moser, V.C., McDaniel, K.M., 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.
28. Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol*., 1, 233-236.
29. Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol*., 13, 599-609.
30. Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol*., 29: 198-201.
31. EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006)
32. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32, 126-131.

© OCDE 2018