OECD/OCDE 453

Adoptée:
25 Juin 2018

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

ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGENÈSE

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 453 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) (5). La mise à jour de la LD 453 a été effectuée en parallèle avec la révision des LD 451 (études de cancérogenèse) et 452 (études de toxicité chronique) 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. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B : évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de toxicité chronique et de cancérogenèse 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, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente Ligne directrice et dans la LD 409 - Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours (6), comme indiqué dans le Document d'orientation de l'OCDE sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse 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 (7).

© 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.

4. La présente Ligne directrice porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse. Bien que des études à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par 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 et de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou 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 (7) (8) et par voie cutanée (7). Les LD 412 (9) et 413 (10), ainsi que le Document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (8), sont tout particulièrement consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. La LD 410 (11) est consultée dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

5. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas de substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation 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 de toxicité chronique et de cancérogenèse couvertes par la présente Ligne directrice pour les essais sont les suivants :

- Identification des propriétés cancérogènes d'un produit chimique susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents;
- Identification du temps d'apparition de néoplasmes;
- Identification de la toxicité chronique d'un produit chimique;
- Identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la toxicité chronique et de la cancérogenèse;
- 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);
- Extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses;
- Prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine;

© OCDE 2018

- Obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle et la toxicité chronique 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 les propriétés toxicologiques de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le Document d'orientation No. 116 (7).

8. 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 de toutes les études de toxicité *in vitro* ou *in vivo* menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérogène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'un produit chimique (16) (17) (18) (19).

9. 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, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de 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 n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le Document d'orientation de l'OCDE No. 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). 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*

© OCDE 2018

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. »

11. 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 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses 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 de l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (LD 453) considérée ici.

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser cette 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 (DL 451). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, et un moindre recours aux animaux, 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. Lors de la réalisation d'une telle étude combinée, il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 11 et 22 à 26) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées. On trouvera dans le Document d'orientation No. 116 (7) des indications supplémentaires sur les moyens de concevoir de manière optimale l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et en rationalisant les diverses procédures expérimentales.

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente Ligne directrice figurent dans le Document d'orientation No. 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'étude comprend deux phases parallèles: une phase chronique et une phase de cancérogenèse (dont les durées respectives font l'objet des paragraphes 34 et 35). Le produit chimique testé est normalement administrée par la voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peuvent aussi être appropriées. Durant la phase chronique, la substance à tester est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, à raison d'un niveau de dose par groupe, 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 34). Cette durée est suffisamment longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. 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 inclus dans l'étude (voir paragraphe 20). Durant la phase de cancérogenèse, la substance est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux pendant la plus grande partie de leur vie. Au cours des deux phases, les animaux sont observés attentivement pour déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques.

© OCDE 2018

Les animaux qui meurent ou 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

15. La présente Ligne directrice traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, 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. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique et de cancérogenèse avec des espèces de non-rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient suivre les principes décrits dans la présente Ligne directrice ainsi que dans la LD 409, Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours (6). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le Document d'orientation No. 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse 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. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme (voir le Document d'orientation No. 116 (7)), il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La 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

© OCDE 2018

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 lors 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 la substance est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. 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 micropuce ou toute autre méthode appropriée

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Pour les rongeurs, chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22) et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de cancérogenèse de l'étude comprend donc au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il sera possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée et non égale en nombre dans les divers groupes de dose, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. Chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22), et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de toxicité chronique de l'étude, comprend au moins, dans le cas des rongeurs, 10 animaux de chaque sexe. On notera que ce nombre est plus faible que celui préconisé dans l'étude de toxicité chronique de la LD 452. L'interprétation des données obtenues à partir de ce nombre réduit d'animaux par groupe dans la phase de toxicité chronique de la présente étude combinée s'appuie cependant sur les données provenant des animaux plus nombreux étudiés lors de la phase de cancérogenèse de l'étude. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe traité lors de la phase de toxicité chronique pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude et le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique dans le Document d'orientation No. 116 (7).

© OCDE 2018

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

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 6 mois pour la phase de toxicité chronique, afin de recueillir des données sur la progression des altérations non néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, 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. Les animaux étudiés pendant la phase de toxicité chronique de l'étude, normalement sur une durée de 12 mois (paragraphe 34), fournissent les données correspondant aux sacrifices en cours d'étude pour la phase de cancérogenèse, ce qui réduit le nombre total d'animaux étudiés. Des groupes satellites peuvent aussi être constitués pour la phase de toxicité chronique afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par le produit chimique étudié. Ces investigations pourront ne porter que 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 (30). On trouvera des indications supplémentaires sur les sacrifices en cours d'étude et sur le recours à des animaux satellites et sentinelles, ainsi que sur la limitation du nombre total d'animaux étudiés, dans le Document d'orientation No. 116 (7).

21. Si l'inclusion d'animaux satellites et/ou des sacrifices en cours d'essai sont prévus, le nombre d'animaux dans chaque groupe de dose prévu à cet effet sera normalement de 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux étudiés devra être augmenté du nombre d'animaux devant être sacrifiés avant l'achèvement de l'étude. Les animaux destinés à être sacrifiés en cours d'étude et les animaux satellites 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 dosages

22. Le Document d'orientation No. 116 (7) 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, aussi bien pour la phase de toxicité chronique que pour la phase de cancérogenèse. 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 devront prendre en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance testée ou aux matières apparentées.

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. Pour la phase de toxicité chronique de l'étude, une étude complète portant sur trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme indispensable s'il est possible d'anticiper qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ne produira probablement pas d'effets indésirables. La décision est fondée

© OCDE 2018

sur les résultats d'études préliminaires et sur l'absence probable de toxicité du produit chimique testé, compte tenu des données disponibles sur des substances structurellement apparentées. Une limite de 1 000 mg/kg de 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.

25. 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. La plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). 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 négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.

26. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance à tester, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir le paragraphe 27). 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 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. Le principal objectif lors de la réalisation d'une étude combinée de cancérogenèse et de toxicité chronique sera la collecte d'informations à des fins d'évaluation des risques de cancérogenèse, et les données sur la toxicité chronique seront normalement un objectif subsidiaire. Il conviendra de s'en souvenir lors du choix des niveaux de doses et des intervalles entre les doses pour l'étude.

27. Les intervalles entre les doses dépendront des objectifs de l'étude et des caractéristiques du produit chimique testé, et ne peuvent donc pas être prescrits de manière détaillée 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 est justifiée.

28. Comme le précise le Document d'orientation No. 116 (7), 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 les doses internes et externes surviennent ou non;
- Lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents;

© OCDE 2018

- 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, en particulier lors du choix des doses moyennes et faibles.

29. Le groupe témoin sera 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.

Préparation des doses et administration du produit chimique testé

30. 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 (7). 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.

31. 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 de données 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).

32. 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

© OCDE 2018

normalement pas 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.

33. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne du produit chimique testé (à raison de 7 jours par semaine) et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse) pour les rongeurs (voir aussi les paragraphes 33 et 34). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, donne lieu à 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 spécifie la LD 410 (11), et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). 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 (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). 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 fait l'objet d'une justification. Voir aussi à ce sujet la LD 412 (9).

34. 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 journalière 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 n'excède normalement pas 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). 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 permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

35. Si la période d'administration et la durée de la phase chronique de cette étude sont normalement de 12 mois, le plan de l'étude permet une application à des essais 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. Le traitement de tous les groupes de doses affectés à cette phase est interrompu au moment prévu pour l'évaluation de la toxicité chronique et de lésions pathologiques non néoplasiques. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance chimique testée 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.

© OCDE 2018

36. La durée de la phase de cancérogenèse de cette étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle peut être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais ce changement de durée fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le Document d'orientation No. 116 (7):

- La clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent;
- La clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée;
- La survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe;
- L'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

OBSERVATIONS (PHASE DE TOXICITÉ CHRONIQUE)

37. 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 générales 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.

38. 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 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 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) (32).

39. 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

© OCDE 2018

animaux, mais au moins sur ceux du groupe traité 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 observations suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.

40. 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 et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (32) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (33) (34) (35) et une évaluation de la force de préhension (36) ainsi que de l'activité motrice (37) 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.

41. 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 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 alimentaire

42. 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 aussi 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

43. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur tous les animaux d'expérience (10 mâles et 10 femelles par groupe) à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). 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 19). 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.

44. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): 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

© OCDE 2018

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 être également indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

45. 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 tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques. 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. Des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, sont superflus 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 (38): 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) (39) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (39). 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 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.

46. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux 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 (38) : aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres

[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

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.

47. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il est nécessaire 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 (38). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 58), il convient d'envisager d'en obtenir.

Pathologie

Autopsie macroscopique

48. 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 leurs contenus. 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 spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 21). 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 pourra devoir être effectuée au cas-par-cas, à la discrétion du directeur de l'étude.

49. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 47. 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.

50. 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 (40) (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 d'examiner 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. Dans 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 des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

51. Des infrmations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants :

© OCDE 2018

- 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.

OBSERVATIONS (PHASE DE CANCÉROGENÈSE)

52. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique est aussi effectuée une fois par jour. Dans le cas d'une étude par gavage, les animaux sont examinés immédiatement après l'administration de la dose. Une attention particulière devra être accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

53. 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 aussi 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, biochimie clinique et autres mesures

54. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision concernant ces prélèvements appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. Les données obtenues sur les animaux étudiés dans la phase de toxicité chronique, normalement d'une durée de 12 mois (voir paragraphe 34), renseignent sur ces paramètres. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le Document d'orientation No. 116 (7). Les éventuels prélèvements sanguins sont à recueillir à la fin de l'étude, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux. Ils sont effectués en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital, sous anesthésie. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène pendant la phase de cancérogenèse ait été mise en question (38).

© OCDE 2018

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

55. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20), font 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 leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut être effectuée au cas-par-cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles sont collectées dans l'année suivant le début de l'étude.

56. 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 (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif) :

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			

© OCDE 2018

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 d'examiner 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. Dans 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 des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

57. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). 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, notamment des tumeurs;
- Lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez 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 (CANCÉROGENÈSE ET TOXICITÉ CHRONIQUE)

Résultats

58. 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.

59. 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

© OCDE 2018

issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire, portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

60. Si possible, les résultats numériques sont 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 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

61. 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;
- certificat d'analyse chimique;

Véhicule(le cas échéant):

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

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix fait;
- 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)

Résultats généraux

- Données sur la survie;

© OCDE 2018

- Poids corporel/variations du poids corporel;
- Prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant;
- Données toxicocinétiques (si disponibles);
- Opthalmoscopie (si disponible);
- Hématologie (si disponible);
- Chimie clinique (si disponible);

Résultats cliniques

- Signes de toxicité;
- Incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée;
- Nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes);

Données relatives aux autopsies

- Poids corporel à l'issue de l'essai;
- Poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant;
- Résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies;

Histopathologie

- Observations d'effets histopathologiques non néoplasiques;
- Observations d'effets histopathologiques néoplasiques;
- Corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques;
- Description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité;
- Rapport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs;

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

- Examen de toutes les approches de modélisation;
- Relations dose-réponse;
- Données de contrôle historiques;
- Examen de toutes les informations concernant le mode d'action;
- Détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé);
- 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. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=116283&CFID=1267360&CFTOKEN=65052793&jsessionid=9830b2c4116e3d8fbbf017414e1a782e7f79TR
3. 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.
4. arlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol*. 40, 145-191.
5. 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.
6. OCDE (1998), *Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours*, Ligne directrices No. 409, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
7. OCDE (2009), Draft Guidance Document on the design and conduct of chronic toxicity and carcinogenicity studies, Series on Testing and Assessment No. 116, disponible sur: www.oecd.org/env/testguidelines.
8. OCDE (2009) *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
9. 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.
10. OCDE (2009), *Toxicité subchronique par inhalation : étude sur 90 jour*, Ligne Directrice No. 413, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
11. OCDE (1981), *Toxicité cutanée à doses répétées - étude à 21/28 jours*, Ligne Directrice No. 410, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
12. Boobis, A.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M.E., Vickers, C., Willcocks, D. & Farland, W. IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxic*ol, (2006) 36:793-801.
13. Cohen, S.M., Meek, M.E., Klaunig, J.E., Patton, D.E., and Fenner-Crisp, P.A. (2003) The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589
14. Holsapple, M.P., Pitot, H.C., Cohen, S.N., Boobis, A.R., Klaunig, J.E., Pastoor, T., Dellarco, V.L. & Dragan, Y.P. (2006) Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci*. 89:51-56.
15. Meek, E.M., Bucher, J.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., Hill, R.N., Lehman-McKemmon, L.D., Longfellow, D.G., Pastoor, T., Seed, J. & Patton, D.E. (2003) A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 1-7.
17. 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. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 9-35.

© OCDE 2018

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 37-68.
19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 69-98.
20. OCDE (2002), *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies*, Série sur les essais et évaluations n° 35 et Série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
21. OCDE (2000), *Guidance Document No. 19 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.
22. 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).
23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994) The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.
25. Usui T, Griffiths SA et Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (éd.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter, F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203
27. Directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats 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.
28. 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.
29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
30. 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
31. 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
32. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
33. Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.

© OCDE 2018

34. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol.Environ. Health*, 9, 691-704.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006)
40. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32, 126-131.

© OCDE 2018