

Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques

OCDE 414 : Étude de toxicité pour le développement pré-natal

But : L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés toxiques vis-à-vis du développement pré-natal de la substance testée, c'est-à-dire les effets sur la mère, les pertes pré- ou post-implantatoires, la mortalité foetale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus.

Animaux d'expérience : Il est demandé au moins deux espèces (rongeurs et non rongeurs), généralement le rat et le lapin. Il est conseillé d'utiliser un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir autopsier environ 20 femelles présentant un point d'implantation.

Programmes expérimentaux : La substance testée est administrée aux femelles gravides, pendant la période d'organogenèse : de l'implantation jusqu'à la veille du sacrifice.

La mère est sacrifiée environ 1 jour avant la parturition. Les fœtus sont extraits par césarienne pour éviter une sélection naturelle de la mère (élimination des nouveau-nés malformés ou morts nés).

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :

- pendant l'étude :
 - signes de toxicité, mortalité ;
 - poids corporel ;
 - consommation de nourriture.
- examen terminal de la mère :
 - autopsie ;
 - évaluation macroscopique de tous les organes ;
 - examen de l'utérus : poids de l'utérus gravide, nombre de corps jaunes, sites d'implantations, résorptions ;
 - examen du placenta.
- examen terminal des fœtus :
 - nombre de fœtus vivants et morts ;
 - sexe des fœtus ;
 - poids des fœtus ;

- malformations, anomalies du squelette et des tissus mous.

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués d'après les effets observés chez les fœtus et les mères et en fonction de l'incidence et de la sévérité des effets, d'une relation dose-réponse, des doses auxquelles on observe des effets et doivent permettre de déterminer une dose sans effet toxique pour le développement et pour les mères.

OCDE 415 : Étude de toxicité de la reproduction sur une génération

But : L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets d'une substance testée sur les performances de reproduction des mâles et des femelles, telles que la fonction génitale, le cycle œstral, le comportement lors de l'accouplement, la conception, la gestation, la parturition, la lactation et le sevrage.

Animaux d'expérience : Au moins une espèce, généralement le rat. Il est conseillé d'utiliser un nombre suffisant d'animaux afin d'obtenir au moins 20 femelles gravides.

Programmes expérimentaux : Le traitement doit être appliqué en phase de gamétogenèse, avant l'accouplement : 3 semaines pour le rat femelle et 10 semaines pour le rat mâle. Les animaux sont identifiés et accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle) ou 1 : 2 (un mâle pour deux femelles). Le traitement se poursuit pendant l'accouplement, puis jusqu'au sevrage des nouveau-nés pour les femelles. Les mâles sont sacrifiés après l'accouplement et les femelles après le sevrage.

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :

– Pendant l'étude :

- signes de toxicité, mortalité ;
- comportement pendant la gestation ;
- poids corporel ;
- consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation) ;
- durée de gestation ;
- parturition.

– Après la naissance :

- mortalité à la naissance ;
- nombre et sexe des petits ;
- poids à la naissance et à J4, puis chaque semaine jusqu'à la fin de l'étude ;
- développement physique, malformations ou anomalies ;
- fonctions sensorielles et réflexes ;
- survie jusqu'à 1 semaine.

– Examen terminal :

- examen macroscopique des adultes et des nouveau-nés ;
- examens histologiques des organes de la reproduction des adultes (testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate, glande coagulante, ovaires, utérus, cervix, vagin, hypophyse) ;
- isolement des autres organes pour examen histologique éventuel.

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués d'après les effets observés et en fonction des doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité) et doivent permettre de déterminer la dose sans effet. Ces études doivent fournir une estimation satisfaisante d'une dose sans effet toxique et permettre d'évaluer les effets nocifs sur la reproduction, la parturition, la lactation et la croissance postnatale des nouveau-nés.

OCDE 416 : Étude de toxicité de la reproduction sur deux générations

But : L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets d'une substance testée sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gravité, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement de la descendance et orienter des essais ultérieurs. Cette ligne directrice étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, ainsi que la croissance et le développement de la génération F2. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels, en complétant le présent protocole d'après les lignes directrices se rapportant à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou, en étudiant ces effets dans le cadre d'autres essais, en utilisant les lignes directrices appropriées.

Animaux d'expérience : Au moins une espèce, généralement le rat. Il est conseillé d'utiliser un nombre suffisant d'animaux afin d'obtenir au moins 20 femelles gravides.

Programmes expérimentaux : La substance d'essai est administrée durant la phase de gamétogenèse avant l'accouplement : durant plusieurs cycles œstraux pour la femelle et un cycle de spermatogenèse complet pour le mâle (70 jours chez le rat ; 56 jours chez la souris). Les animaux sont identifiés et accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle) ou 1 : 2 (un mâle pour deux femelles). Les animaux parents (génération P) continuent à être

traités pendant la période d'accouplement (mâles et femelles), de gravidité et jusqu'au sevrage des nouveau-nés (femelle uniquement). Après le sevrage, les nouveau-nés (génération F1) sont eux aussi traités puis accouplés entre eux (mâle et femelle de portées différentes). La procédure ensuite est identique à celle appliquée aux animaux parents jusqu'à la production d'animaux de la deuxième génération (génération F2).

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :

- pendant l'étude :
 - signes de toxicité, mortalité ;
 - comportement pendant la gestation ;
 - poids corporel ;
 - consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation) ;
 - durée de gestation ;
 - parturition.
- après la naissance :
 - mortalité à la naissance ;
 - nombre et sexe des nouveau-nés ;
 - poids à la naissance et à J4, puis chaque semaine jusqu'à la fin de l'allaitement ;
 - développement physique, malformations ou anomalies ;
 - activité réflexe, fonctions sensorielles et réflexes ;
 - informations relatives à la maturité sexuelle ;
 - survie jusqu'à 1 semaine.
- examen terminal :
 - examen macroscopique des adultes et des nouveau-nés ;
 - pesée des organes de la reproduction des animaux (P et F1) : testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate, glande coagulante, ovaires, utérus ;
 - pesée des organes suivants : cerveau, foie, rate, hypophyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus chez les animaux (P et F1) ;
 - pesée du cerveau, de la rate et du thymus des petits (F1 et F2) destinés à l'autopsie ;
 - isolement des autres organes pour examen histologique éventuel ;
 - examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents (P et F1) (testicules, épидидymes, vésicules séminales, glande coagulante, prostate, ovaires, utérus, cervix, hypophyse).

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité). Ils permettent de déterminer la dose sans effet. Ainsi on peut évaluer les effets sur la reproduction, la parturition, l'allaitement, la croissance postnatale et la maturation sexuelle des nouveau-nés.

OCDE 421 : Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement

But : L'objectif de cette étude est d'obtenir une première série d'informations sur les effets possibles d'une substance sur les performances de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Cette ligne directrice ne vient pas en remplacement des lignes directrices OCDE 414, 415 et 416 ; elle ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. Des résultats négatifs obtenus avec cette méthode, bien qu'ils ne garantissent pas une entière sécurité pour la reproduction et le développement, peuvent dans une certaine mesure apaiser les craintes si l'exposition effective a été incontestablement inférieure à la concentration maximale sans effet nocif observé (CSENO).

Animaux d'expérience : Cette méthode vise les essais sur le rat. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 animaux de chaque sexe, pour obtenir au moins 8 femelles gestantes/dose.

Programmes expérimentaux : La substance testée est administrée aux mâles et aux femelles et doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement. Cette administration se poursuit pendant la période d'accouplement (14 jours maximum). Les mâles sont traités un minimum de 4 semaines. L'administration aux femelles de la génération parentale continue pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3^e jour post-partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. Les animaux sont accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle). Tout au long de l'essai, les animaux sont soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour. Les signes de parturition difficile ou prolongée, les signes de toxicité, mortalité comprise doivent être consignés. Les mâles sont généralement sacrifiés après l'accouplement après un minimum de traitement de 28 jours. Les femelles de la génération parentale ainsi que les nouveau-nés survivants sont sacrifiés au 4^e jour post-partum.

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :

- pendant l'étude :
 - signes de toxicité, mortalité ;
 - poids corporel ;
 - consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation ainsi qu'à J0-J1 et à J4 du post-partum) ;
 - durée de gestation ;
 - parturition ;
 - mortalité à la naissance ;
 - nombre et sexe des nouveau-nés ;
 - poids des portées à J0-1 et à J4 post-partum ;

- développement physique, malformations ou anomalies ;
- fonctions sensorielles et réflexes ;
- survie jusqu'à 1 semaine - comportement pendant la gestation ;
- après sacrifice :
- autopsie générale ;
- pesée des organes de la reproduction des mâles (P) : testicules, épидидymes ;
- examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents ayant reçu les doses les plus élevées (testicules, épидидymes, ovaires) ;
- examen macroscopique des nouveau-nés ou des petits morts (anomalies) ;
- nombre de sites d'implantation et de corps jaunes.

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles (anomalies, action sur la reproduction, fertilité, modification du poids corporel, organes cibles, atteintes histologiques, mortalité), et doivent permettre de déterminer une dose sans effet. Ces données contribuent à l'évaluation des effets sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et le développement postnatal des nouveau-nés.

OCDE 422 : Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement

But : L'objectif de cette étude est d'obtenir des informations initiales relatives aux dangers possibles pour la santé découlant d'expositions répétées pendant une période relativement limitée incluant la neurotoxicité et l'immunotoxicité. Cette méthode d'essai permet également de fournir des informations initiales sur les effets possibles sur la reproduction et le développement : tels que la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Cette ligne directrice ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement et ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. Des résultats négatifs obtenus avec cette méthode, bien qu'ils ne garantissent pas une entière sécurité pour la reproduction et le développement, peuvent dans une certaine mesure apaiser les craintes si l'exposition effective a été incontestablement inférieure à la concentration maximale sans effet nocif observé (CSENO).

Animaux d'expérience : Cette méthode vise les essais sur le rat. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 animaux de chaque sexe, pour obtenir au moins 8 femelles gestantes/dose.

Programmes expérimentaux : La substance testée est administrée aux mâles et aux femelles et doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement. Cette administration se poursuit pendant la période d'accouplement (14 jours maximum). Les mâles sont traités un minimum de 4 semaines. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou, le cas échéant, maintenus en vie et restent

soumis à l'administration de doses en vue d'un second accouplement, si on le juge approprié. Lorsque la substance est administrée par voie orale, le traitement des femelles de la génération parentale se poursuit pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3^e jour post-partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. Les animaux sont accouplés selon un rapport 1 : 1 (un mâle pour une femelle). Tout au long de l'essai, les animaux sont soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour. Les signes de parturition difficile ou prolongée, les signes de toxicité, mortalité comprise, doivent être consignés. Les mâles sont généralement sacrifiés après l'accouplement après un minimum de traitement de 28 jours. Les femelles de la génération parentale ainsi que les nouveau-nés survivants sont sacrifiés au 4^e jour post-partum.

En règle générale, on doit disposer d'au moins 3 groupes de traitement et 1 groupe témoin. Sous certaines conditions, un essai limite peut être réalisé.

Observations :

- pendant l'étude :
 - signes de toxicité, mortalité ;
 - examen clinique minutieux (comportements, démarches, stéréotypes, activités réflexes...) ;
 - évaluation de la réactivité sensorielle à des stimuli auditif, visuel et proprioceptif, la force d'agrippement et l'activité motrice... ;
 - hématologie et biochimie clinique ;
 - poids corporel ;
 - consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation ainsi qu'à J0-J1 et à J4 du post-partum) ;
 - durée de gestation ;
 - comportement pendant la gestation ;
 - parturition ;
 - mortalité à la naissance ;
 - nombre et sexe des nouveau-nés ;
 - poids des portées à J0-J1 et à J4 post-partum ;
 - développement physique, malformations ou anomalies ;
 - fonctions sensorielles et réflexes ;
 - survie.
- après sacrifice :
 - autopsie générale ;
 - pesée des organes de la reproduction des mâles (P) : testicules, épидидymes ;
 - examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents (testicules, épидидymes, ovaires, utérus et organes sexuels secondaires) ;
 - examens histologiques des organes tels que : foie, rein, surrénales, thymus, rate, cerveau, cœur, moelle épinière, estomac, intestin grêle, gros intestin, trachée, poumons, vessie, ganglions lymphatiques, nerf périphérique, moelle osseuse ;
 - examen macroscopique des nouveau-nés ou des petits morts ;
 - nombre de corps jaunes (facultatif) et de sites d'implantation ;

- examens histologiques des organes de la reproduction des animaux parents (P et F1) (testicules, épидидymes, vésicules séminales, glande coagulante, prostate, ovaires, utérus, cervix, vagin, hypophyse) ;
- examen macroscopique des nouveau-nés ou des petits morts (anomalies).

Rapport et données : Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles ces effets (anomalies, action sur la reproduction, fertilité, modification du poids corporel, organes cibles, atteintes histologiques, mortalité) sont observés et doivent permettre de déterminer la dose sans effet. Ces données doivent rendre possible l'évaluation des effets sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et la croissance postnatale des nouveau-nés.

OCDE 426 : Étude de neurotoxicité pour le développement

But : Les études de neurotoxicité sur le développement ont pour objectif de produire des résultats relatifs aux effets fonctionnels et morphologiques potentiels exercés sur le système nerveux en développement de la progéniture après exposition *in utero* et aux premiers stades de la vie, notamment des caractérisations par des courbes de réponse à la dose.

Animaux d'expérience : L'espèce animale expérimentale recommandée est le rat. D'autres espèces peuvent être utilisées sous réserve de respecter certaines conditions décrites dans cette ligne directrice. Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre suffisant de femelles gravides exposées à la substance à tester afin de garantir l'obtention d'un nombre adéquat de descendants pour évaluer la neurotoxicité. Un nombre total de 20 portées est recommandé pour chaque niveau de dose.

Programmes expérimentaux : Les petits sont sélectionnés pour chaque groupe de dose et affectés à une évaluation ciblée des effets à partir du jour 4 après la naissance. La sélection des petits doit permettre, dans la mesure du possible, une représentation équilibrée des deux sexes de chaque portée, pour chaque groupe de dose, dans tous les essais. On doit utiliser trois niveaux de doses différents et un groupe témoin en parallèle. La dose élevée ne doit pas dépasser 1 000 mg/kg/jour de poids corporel, sauf exception.

La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés au minimum quotidiennement aux femelles fécondées généralement à partir du moment de l'implantation (JG- Jour de gestation 6) et jusqu'à la fin de la lactation (J21 postnatal), de façon à exposer les petits à la substance d'essai pendant le développement neurologique prénatal et postnatal. Ces moments d'administration peuvent être ajustés si besoin.

Observations

– observation des mères :

Conditions sanitaires des mères, notamment morbidité et mortalité, au moins une fois par jour. Des observations cliniques plus détaillées doivent être

réalisées périodiquement sur au moins dix mères par dose. Seront observées (liste non exhaustive) : des modifications de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, la présence de sécrétions et l'activité autonome (par exemple, larmolement, horripilation, taille des pupilles, mode de respiration inhabituel, et/ou respiration par la bouche, et tous signes inhabituels de miction ou défécation). Il faut également noter toutes les réponses inhabituelles relatives à la position du corps, à l'intensité de l'activité et à la coordination des mouvements. Les signes de toxicité doivent être enregistrés. Les animaux sont pesés, la consommation d'aliments et d'eau est notée.

– observation de la progéniture :

Tous les petits doivent être attentivement examinés au moins quotidiennement pour détecter les signes de toxicité et déterminer la morbidité et la mortalité.

Des effets fonctionnels ou comportementaux vont être recherchés par la mesure de l'ontogénie comportementale (ex. : réflexe de redressement, géotaxie négative et activité motrice), le suivi de l'activité motrice, l'étude des fonctions motrice et sensorielle, des essais d'apprentissage et de mémoire.

Les mères sont euthanasiées après sevrage de leur progéniture. L'évaluation neuropathologique des descendants sera menée sur des tissus prélevés sur des animaux sacrifiés au 22^e jour postnatal ou entre le 11^e jour et 22^e et également à la fin de l'étude.

Rapports et données : Le rapport d'essai doit comporter de nombreuses informations qui sont listées dans la ligne directrice. L'objectif d'une étude de neurotoxicité développementale est de fournir des informations sur les effets d'une exposition répétée à une substance pendant le développement *in utero* et postnatal précoce. L'étude est axée tant sur la toxicité générale que sur les effets neurotoxiques sur le développement, et c'est pourquoi les résultats de l'étude devront permettre de distinguer les effets neurodéveloppementaux qui apparaissent en l'absence de toxicité maternelle générale de ceux qui ne sont exprimés qu'à des doses également toxiques pour la mère. La complexité des interrelations entre le modèle de l'étude, l'analyse statistique et la signification biologique des résultats exige l'avis d'un expert pour assurer une interprétation correcte des données de neurotoxicité pour le développement. L'interprétation des résultats de l'essai observera une approche basée sur le poids de la preuve.