

PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ ET DES AUTRES EFFETS SUR LA SANTÉ

INTRODUCTION GÉNÉRALE: PARTIE B

A. NOTE EXPLICATIVE

Pour la présente introduction, la numérotation est la suivante:

B.15 Mutation génique, *Saccharomyces cerevisiae*

B.16 Recombinaison mitotique, *Saccharomyces cerevisiae*

B.17 Cellules de mammifère in vitro, essai de mutation génique

B.18 Lésion et réparation de l'ADN - synthèse non programmée de l'ADN (UDS) cellules de mammifère in vitro

B.19 Essai in vitro d'échange de chromatides soeurs

B.20 Test de létalité récessive liée au sexe chez *Drosophila melanogaster*

B.21 Tests de transformation sur cellules de mammifère in vitro

B.22 Tests de létalité dominante chez le rongeur

B.23 Essai d'ABERRATION chromosomique sur spermatogonies de mammifère

B.24 Spot test chez la souris

B.25 Translocation héréditaire chez la souris

B.26 Toxicité orale subchronique: étude de 90 jours sur des rongeurs

B.27 Toxicité orale subchronique: étude de 90 jours sur des espèces n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs

B.28 Toxicité dermique subchronique: étude de 90 jours sur des rongeurs

B.29 Toxicité subchronique par inhalation: étude de 90 jours sur des rongeurs

B.30 Étude de la toxicité chronique

B.31 Étude de tératogénicité

B.32 Étude de cancérogénèse

B.33 Étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité

B.34 Test de reproduction sur une génération

B.35 Test de reproduction sur deux générations

B.36 Toxicocinétique

B. DÉFINITIONS GÉNÉRALES DES TERMES EMPLOYÉS DANS LES MÉTHODES D'ESSAI FIGURANT DANS LA PRÉSENTE ANNEXE

- i) La toxicité aiguë correspond aux effets indésirables qui se manifestent dans un intervalle de temps donné (généralement 14 jours) après administration d'une dose unique d'une substance.
- ii) La toxicité évidente est un terme général qui décrit les signes manifestes de toxicité résultant de l'administration d'une substance d'essai. Ces signes doivent être suffisamment marqués pour permettre une évaluation des dangers et sont tels qu'une augmentation de la dose administrée est susceptible d'entraîner des effets toxiques graves et éventuellement la mort.
- iii) La dose est la quantité de substance administrée. Elle est exprimée en poids (gramme et milligramme) ou en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, milligrammes par kilogramme de poids corporel), ou encore en concentration alimentaire constante (parties par million ou milligrammes par kilogramme d'aliment).
- iv) La dose discriminante est la plus forte des quatre doses fixées pouvant être administrée sans entraîner une mortalité liée à la substance (y compris animaux sacrifiés pour raisons humanitaires).
- v) Le dosage est un terme général qui comprend la dose administrée, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.
- vi) La DL50 (dose létale médiane) est la dose unique d'une substance, calculée statistiquement, censée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels elle est administrée. La DL50 est exprimée en poids de la substance étudiée par unité de poids corporel de l'animal soumis à l'expérimentation (milligrammes par kilogramme).

vii) La CL50 (concentration létale moyenne) est la concentration d'une substance, calculée statistiquement, susceptible de provoquer, lors d'une exposition ou dans un laps de temps donné après exposition, la mort de 50 % des animaux exposés pendant une durée déterminée. La CL50 est exprimée en poids de la substance étudiée rapporté à un volume standard d'air (milligrammes par litre).

viii) La NOAEL est l'abréviation de l'anglais "no observed adverse effect level" (dose sans effet indésirable observé) et correspond à la dose ou au niveau d'exposition maximum auquel aucun effet adverse lié au traitement n'est observé.

ix) La toxicité subchronique par administration répétée correspond aux effets indésirables qui se manifestent chez les animaux d'expérience qui reçoivent une administration quotidienne d'une substance chimique ou qui sont exposés quotidiennement à cette substance pendant une période brève par rapport à leur espérance de vie.

x) La dose maximale tolérée (DMT) est la plus forte dose provoquant des signes de toxicité chez les animaux sans entraîner d'effet majeur sur leur survie en ce qui concerne l'essai dans lequel elle est utilisée.

xi) L'irritation cutanée correspond aux modifications cutanées de nature inflammatoire qui apparaissent après application d'une substance sur la peau.

xii) L'irritation des yeux correspond aux modifications oculaires qui apparaissent après application d'une substance sur la surface antérieure de l'oeil.

xiii) La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée d'origine immunologique à une substance.

xiv) La corrosion dermique désigne les lésions cutanées irréversibles qui résultent de l'application d'une substance sur la peau pendant une période comprise entre 3 minutes et 4 heures.

xv) La toxicocinétique est l'étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances étudiées.

xvi) L'absorption est le(s) processus par le(s)quel(s) une substance administrée pénètre dans l'organisme.

xvii) L'excrétion est le(s) processus par le(s)quel(s) la substance administrée et/ou ses métabolites sont éliminés de l'organisme.

xviii) La distribution est le(s) processus par le(s)quel(s) la substance absorbée et/ou ses métabolites se répartissent dans l'organisme.

xix) Le métabolisme est le(s) processus par le(s)quel(s) la substance administrée subit dans l'organisme des réactions enzymatiques ou non qui aboutissent à des modifications de sa structure.

B.1 Toxicité aiguë - toxicité par administration répétée/toxicité subchronique et chronique

Divers essais (méthodes B.1 - B.5) permettent d'évaluer les effets toxiques et la toxicité aiguë d'une substance pour l'ensemble de l'organisme ou pour certains organes; suite à l'administration d'une dose unique, ces essais fournissent une première indication de la toxicité de la substance. En fonction de la toxicité de la substance, on peut envisager un essai limite jusqu'à une étude complète menant à l'établissement d'une DL50, bien qu'aucun essai limite ne soit prescrit pour les études par inhalation puisqu'il n'a pas été possible de définir une valeur limite unique pour l'exposition par inhalation.

La préférence doit être accordée aux méthodes qui utilisent le moins d'animaux possible et qui minimisent les souffrances de ces derniers, par exemple, la "méthode des doses fixes" (méthode B.1 bis) et la "méthode de toxicité aiguë" (méthode B.1 ter). Pour les essais de niveau 1, une étude sur une seconde espèce peut compléter les conclusions de la première étude. Dans ce cas, on utilisera une méthode d'essai standard ou on adaptera la méthode pour un plus petit nombre d'animaux.

L'essai de toxicité par administration répétée (méthodes B.7, B.8 et B.9) comporte une évaluation des effets toxiques résultant d'une exposition répétée. L'observation clinique des animaux doit

être minutieuse, afin de recueillir le maximum d'informations possible. Ces essais doivent permettre de déterminer la toxicité sur les organes cibles, ainsi que les doses non toxiques. Ces aspects pourront nécessiter une analyse plus approfondie dans les études à long terme (méthodes B.26 - B.30 et B.33).

B.II Mutagénicité - Génotoxicité

La mutagénicité concerne l'induction de modifications permanentes et transmissibles, la quantité ou la structure du matériel génétique des cellules ou des organismes. Ces modifications ou "mutations" peuvent concerner un gène unique ou des segments d'un gène, un bloc de gènes ou des chromosomes entiers. Les effets sur les chromosomes (entiers) peuvent être structurels et/ou numériques.

L'activité mutagène d'une substance est évalué à l'aide d'essais in vitro, sur des bactéries (méthode B.13/14) pour les mutations géniques (ponctuelles), et/ou sur des cellules de mammifères pour les aberrations chromosomiques structurelles (méthode B.10).

Les méthodes in vivo sont également acceptables, par exemple l'essai du micronoyau (méthode B.12) ou l'analyse de métaphase de cellules de moelle osseuse (méthode B.11). Néanmoins, et en l'absence de contre-indication, les méthodes in vitro sont nettement préférables.

Les gros volumes de production peuvent nécessiter des études complémentaires pour préciser le potentiel mutagène d'une substance ou effectuer des essais préliminaires de dépistage d'un éventuel effet cancérigène, et/ou réaliser ou assurer le suivi de l'évaluation des risques et ces études peuvent avoir plusieurs utilités: confirmer les résultats des essais de base, analyser des critères non étudiés (end-points) dans les essais de base, servir de point de départ ou de complément à des études in vivo.

À cet effet, les méthodes B.15 à B.25 utilisent des systèmes eucaryotes in vivo et in vitro et portent sur une plus large série de systèmes biologiques. Ces essais fournissent des informations sur les mutations ponctuelles et sur d'autres critères chez des organismes plus complexes que les bactéries utilisées dans les essais de base.

En règle générale, lorsqu'un programme complémentaire d'études de mutagénicité est envisagé, celui-ci doit être conçu pour permettre l'obtention d'informations complémentaires pertinentes sur le potentiel mutagène ou cancérigène de la substance en question.

Les études qui s'avèrent nécessaires dans un cas précis dépendent de nombreux facteurs, notamment des caractéristiques physiques et chimiques de la substance, des résultats des premiers essais bactériens et cytogénétiques, du profil métabolique de la substance, des résultats d'autres études de toxicité et des utilisations connues de la substance. Étant donné la diversité des facteurs à prendre en considération, un schéma rigide de sélection des essais ne semble pas opportun.

La directive 93/67/CEE définit certains principes généraux en matière de stratégie, mais un document, le guide technique pour l'Évaluation des Risques présente des stratégies précises qui sont néanmoins souples et peuvent être adaptées en fonction des circonstances.

Les méthodes d'études complémentaires ont néanmoins été regroupées ci-après, en fonction du principal paramètre (end-point) génétique analysé.

Études portant sur les mutations géniques (ponctuelles)

- a) Études des mutations directes ou inverses sur micro-organismes eucaryotes (*Saccharomyces cerevisiae*) (méthode B.15)
- b) Études in vitro des mutations directes sur cellules de mammifère (méthode B.17)
- c) Test de létalité récessive liée au sexe sur *Drosophila melanogaster* (méthode B.20)
- d) Test de mutation génétique sur cellules somatique in vivo, test des taches chez la souris (spot test - méthode B.24)

Études portant sur les aberrations chromosomiques

- a) Études cytogénétiques in vivo chez les mammifères; une analyse en métaphase des cellules de moelle osseuse in vivo doit être envisagée lorsqu'elle n'a pas été réalisée lors de l'évaluation initiale (méthode B.11). Il est en outre possible d'étudier la cytogénétique des cellules germinales

in vivo (méthode B.23)

b) Études cytogénétiques in vitro sur cellules de mammifère, lorsqu'elles n'ont pas été réalisées lors de l'évaluation initiale (méthode B.10)

c) Études de létalité dominante chez les rongeurs (méthode B.22)

d) Test de translocation héréditaire chez la souris (méthode B.25)

Effets génotoxiques - effets sur l'ADN

La génotoxicité, caractérisée par des altérations potentielles du matériel génétique non nécessairement liées à la mutagénicité, peut se manifester par des lésions de l'ADN sans preuve directe de mutation. Les méthodes ci-après qui utilisent des micro-organismes eucaryotes ou des cellules de mammifère peuvent s'avérer utiles pour étudier ces phénomènes:

a) Recombinaison mitotique sur *Saccharomyces cerevisiae* (méthode B.16)

b) Lésion et réparation de l'ADN - synthèse non programmée de l'ADN sur cellules de mammifère - in vitro (méthode B.18)

c) Échange de chromatides soeurs sur cellules de mammifère - in vitro (méthode B.19)

Méthodes alternatives pour la recherche du potentiel cancérigène

Des tests de transformation sur cellules de mammifère permettent de mesurer la capacité d'une substance à induire, dans une culture cellulaire, des modifications morphologiques et

comportementales qui sont supposées être associées à une transformation maligne in vivo

(méthode B.21). Un certain nombre de types cellulaires et de critères de transformation différents peuvent être utilisés.

Évaluation du risque d'effets héréditaires chez les mammifères

Il existe plusieurs méthodes qui permettent de mesurer, chez les mammifères, les effets héréditaires induits par des mutations géniques (ponctuelles), par exemple, le test du locus spécifique chez la souris qui permet de mesurer les mutations intervenues sur les cellules germinales dans la première génération (non décrit dans la présente annexe), ou par des aberrations chromosomiques, par exemple, le test de translocation héréditaire chez la souris (méthode B.25). Ces méthodes peuvent être utilisées pour apprécier le risque génétique que peut présenter une substance pour l'homme. Toutefois, étant donné la complexité de ces essais et le nombre élevé d'animaux requis, en particulier pour le test du locus spécifique, ces études ne doivent être entreprises que lorsqu'elles sont pleinement justifiées.

B.III Cancérogénicité

Les substances chimiques peuvent être considérées comme des agents cancérigènes génotoxiques ou non génotoxiques, selon le mécanisme d'action présumé.

Les études de mutagénicité/génotoxicité peuvent fournir des informations préalables permettant de dépister le potentiel cancérigène génotoxique d'une substance. Des informations complémentaires seront fournies par les essais de toxicité par administration répétée, de toxicité subchronique ou de toxicité chronique. L'essai de toxicité par administration répétée, méthode B.7 et les études de toxicité à plus long terme comprennent une évaluation des modifications histopathologiques observées, par exemple de l'hyperplasie de certains tissus qui peuvent être inquiétant. Ces études ainsi que les informations toxicocinétiques peuvent aider à mettre en évidence les substances chimiques ayant un potentiel cancérigène qui pourrait alors être approfondi dans le cadre d'un essai de cancérogénicité (méthode B.32) ou souvent d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité (méthode B.33).

B.IV Toxicité pour la reproduction

La toxicité pour la reproduction peut se manifester de différentes façons, notamment par des troubles de la fonction ou de la capacité reproductrice mâle ou femelle, qualifiés d'"effet sur la fertilité", ou par l'apparition d'effets néfastes non transmissibles chez les descendants, qualifiés de "toxicité pour le développement" qui englobe également la tératogénicité et les effets durant l'allaitement.

Pour les études de tératogénicité qui font partie de l'étude de la toxicité pour le développement, la méthode d'essai (méthode B.31) porte principalement sur l'administration par voie orale. D'autres

voies d'administration sont également possibles en fonction des propriétés physiques de la substance d'essai ou de la voie probable d'exposition humaine. Dans de tels cas, la méthode d'essai doit être convenablement adaptée en tenant compte des éléments pertinents des méthodes d'essai sur 28 jours.

Lorsqu'une étude de la reproduction sur trois générations (fertilité) s'avère nécessaire, il est possible d'utiliser la méthode décrite pour le test de reproduction sur deux générations (méthode B.35) en l'appliquant à une troisième génération.

B.V Neurotoxicité

La neurotoxicité peut se manifester de différentes façons, à savoir par des modifications fonctionnelles et/ou structurelles et par des modifications biochimiques au niveau du système nerveux central ou périphérique. Les essais de toxicité aiguë peuvent donner une première indication de la neurotoxicité. L'essai de toxicité par administration répétée, méthode B.7, comporte une évaluation des effets neurotoxiques; l'observation clinique des animaux doit donc être particulièrement minutieuse, afin de fournir le maximum de renseignements possible. La méthode doit permettre de mettre en évidence les substances chimiques ayant un potentiel neurotoxique qui pourrait nécessiter d'autres études plus approfondies. Il importe en outre d'étudier la capacité des substances à produire des effets neurotoxiques spécifiques qui ne seraient pas détectés par d'autres études de toxicité. Certaines substances organophosphorées, par exemple, ont une neurotoxicité différée que les méthodes B.37 et B.38 permettent d'évaluer, après administration unique ou administration répétée.

B.VI Immunotoxicité

L'immunotoxicité peut se manifester de différentes façons, notamment par une immunosuppression et/ou un renforcement de la réponse immunitaire entraînant soit une hypersensibilité soit une auto-immunité induite. L'essai de toxicité par administration répétée, méthode B.7, comporte une évaluation des effets immunotoxiques. Cette méthode doit permettre de mettre en évidence les substances chimiques ayant un potentiel immunotoxique qui pourrait nécessiter d'autres études plus approfondies.

B.VII Toxicocinétique

Les études toxicocinétiques facilitent l'interprétation et l'évaluation des données de toxicité. Elles ont pour objet d'élucider certains aspects particuliers de la toxicité de la substance chimique étudiée, et leurs résultats peuvent aider à concevoir d'autres études de toxicité. Il n'est pas envisagé de déterminer l'ensemble des paramètres dans tous les cas; la séquence complète des études toxicocinétiques (absorption, excrétion, distribution et métabolisme) n'est nécessaire que dans de rares cas. Pour certains composés, des modifications de cette séquence peuvent être souhaitables, ou une étude par administration unique peut s'avérer être suffisante (méthode B.36).

Les informations concernant la structure chimique (RSA) et les propriétés physico-chimiques peuvent également fournir des renseignements sur les caractéristiques d'absorption par la voie d'administration prévue, ainsi que sur les possibilités de transformation et de distribution dans les tissus. Des études de toxicité et des études toxicocinétiques antérieures peuvent aussi fournir des informations sur les paramètres toxicocinétiques.

C. CARACTÉRISATION DE LA SUBSTANCE À TESTER

Avant d'entreprendre toute étude de toxicité, il faut connaître la composition de la substance à tester, y compris les principales impuretés, ainsi que ses propriétés physico-chimiques dont sa stabilité.

Les propriétés physico-chimiques de la substance fournissent des informations importantes pour le choix de la voie d'administration, pour la conception des différentes études, ainsi que pour la manipulation et le stockage de la substance.

La mise au point d'une méthode d'analyse permettant une évaluation qualitative et quantitative de la substance à tester (y compris, si possible, de ses principales impuretés) dans le véhicule d'administration et dans le matériel biologique doit précéder la mise en oeuvre de l'étude.

Toutes les informations concernant l'identification, les propriétés physico-chimiques, la pureté et le comportement de la substance à tester doivent être consignées dans le procès-verbal d'essai.

D. SOIN DES ANIMAUX

Lors des essais de toxicité, il est essentiel de procéder à des contrôles stricts des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques appropriées de soin des animaux.

i) Conditions d'hébergement

Les conditions ambiantes dans les locaux ou enceintes réservés aux animaux d'expérience doivent être adaptées à l'espèce utilisée pour l'essai. Pour les rats, les souris et les cobayes, la température ambiante doit être de $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins, la température doit être de $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ et l'humidité relative de 30 à 70 %.

Certaines techniques expérimentales sont particulièrement sensibles aux effets thermiques et dans de tels cas, des indications précises concernant les conditions adéquates figurent dans la description de la méthode d'essai. Dans tous les essais de toxicité, la température et l'humidité doivent être contrôlées et consignées, et doivent figurer dans le rapport final d'étude.

Un éclairage artificiel doit garantir l'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les détails concernant les conditions d'éclairage doivent être consignés dans le rapport final d'étude.

Sauf si la méthode prévoit d'autres conditions, les animaux doivent être hébergés individuellement ou mis en cage par petits groupes de même sexe. Les cages collectives ne doivent pas contenir plus de cinq animaux.

Il est important que les comptes rendus d'expérimentation animale précisent le type de cage utilisé et le nombre d'animaux par cage lors de l'exposition à la substance chimique et pendant toute période d'observation qui suit.

ii) Conditions d'alimentation

Le régime alimentaire doit répondre à tous les besoins nutritionnels de l'espèce soumise à l'expérience. Lorsque les substances à tester sont administrées dans la nourriture, il se peut que la valeur nutritionnelle de cette dernière soit amoindrie par une interaction entre la substance et un ingrédient de l'alimentation. Cette éventualité doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai. Les régimes alimentaires classiquement utilisés en laboratoire sont acceptables, l'eau de boisson étant fournie à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être guidé par la nécessité de garantir une proportion appropriée de substance en cas d'administration par cette méthode.

Les contaminants alimentaires qui agissent sur la toxicité ne doivent pas être présents à des concentrations susceptibles d'influencer les résultats.

E. BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX

Le bien-être des animaux est dûment pris en compte lors de l'élaboration des méthodes d'essai.

Quelques exemples sont brièvement cités ci-après, mais cette liste n'est pas exhaustive. Pour connaître les règles et/ou conditions exactes, il faut se référer à l'énoncé des méthodes.

- Pour la détermination de la toxicité orale aiguë, deux méthodes sont envisageables: la "méthode des doses fixes" et la "méthode de classe de toxicité aiguë". La méthode des doses fixes n'utilise pas la mort comme critère spécifique d'évaluation de la toxicité, et nécessite moins d'animaux.

La méthode de la classe de toxicité aiguë utilise en moyenne 70 % d'animaux en moins que la méthode B.1 pour la toxicité orale aiguë. Ces deux méthodes entraînent moins de souffrances et de détresse que la méthode classique.

- Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum scientifiquement acceptable: cinq animaux de même sexe seulement sont testés par dose pour les méthodes B.1 et B.3; 10 animaux seulement (et 5 seulement pour le groupe témoin négatif) sont utilisés pour déterminer la sensibilisation cutanée par la méthode de maximalisation chez le cobaye (méthode B.6); le nombre d'animaux nécessaires comme témoins positifs pour étudier la mutagénicité in vivo est également réduit (méthodes B.11 et B.12).

- La souffrance et la détresse des animaux pendant les essais sont minimisées: les animaux

présentant des signes de souffrance et de détresse intenses et persistantes pourront être euthanasiés; il n'est pas nécessaire d'administrer les substances connues pour provoquer une détresse et une souffrance intenses du fait des propriétés corrosives ou irritantes de la substances (méthodes B.1, B.2 et B.3).

- Les essais limite évitent d'avoir à tester des doses inutilement élevées, tant pour les essais de toxicité aiguë (méthode B.1, B.2 et B.3) que pour les essais de mutagénicité in vivo (méthodes B.11 et B.12).

- Une stratégie relative à la détermination des propriétés irritantes permet désormais de ne pas réaliser l'essai ou de le limiter à un seul animal lorsque des éléments scientifiques probants peuvent être fournis.

Ces éléments scientifiques peuvent être basés sur les propriétés physico-chimiques de la substance, sur les résultats d'autres essais antérieurs, ou sur les résultats d'essais in vitro dûment validés. Par exemple, si une substance a fait l'objet d'une étude de toxicité aiguë par exposition cutanée à la dose limite (méthode B.3) et qu'aucune irritation cutanée n'a été observée, il n'est peut être pas utile d'effectuer d'autres essais d'irritation cutanée (méthode B.4); les produits qui se sont révélés nettement corrosifs ou responsables d'une irritation cutanée grave à la suite d'une étude d'irritation cutanée (méthode B.4) ne doivent pas faire l'objet d'essais complémentaires d'irritation oculaire (méthode B.5).

F. MÉTHODES ALTERNATIVES

Un des objectifs scientifiques de l'Union européenne est de mettre au point et de valider des méthodes alternatives qui fournissent autant d'informations que les expérimentations animales actuelles, mais qui nécessitent moins d'animaux, minimisent leurs souffrances et permettent d'éviter leur sacrifice.

Dès que de telles méthodes sont disponibles, elles doivent être envisagées, chaque fois que cela est possible, pour la caractérisation des dangers et pour la classification et l'étiquetage des substances en fonction des dangers intrinsèques.

G. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

L'extrapolation directe à l'homme des résultats des expériences sur les animaux et des essais in vitro n'est possible que dans certaines limites; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais; aussi, lorsque des effets indésirables ont été mis en évidence chez l'homme, ces données peuvent être utilisées pour confirmer les résultats expérimentaux.

Ces résultats sont utilisables pour la classification et l'étiquetage des produits chimiques nouveaux ou existants pour leurs effets sur la santé humaine sur la base de leurs propriétés intrinsèques mis en évidence et quantifiés par les méthodes préconisées. Les critères correspondants de classification et d'étiquetage figurant à l'annexe VI font également référence aux critères d'évaluation des protocoles d'essais de ces méthodes.

Ces résultats peuvent aussi être utilisés pour les études d'évaluation des risques des produits chimiques nouveaux ou existants, et des stratégies d'essai appropriées sont proposées dans les documents guides correspondants.

H. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

La plupart des méthodes présentées ici sont élaborées dans le cadre du programme de lignes directrices de l'OCDE en matière d'essais. Ces méthodes doivent être mises en oeuvre conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire, afin de garantir l'acceptation mutuelle des données.

De plus amples informations peuvent être obtenues dans les références citées dans les lignes directrices de l'OCDE et dans d'autres publications pertinentes.»

B. 1 ter

TOXICITÉ (ORALE) AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La méthode de la classe de toxicité aiguë fournit des informations à la fois pour l'évaluation des risques et pour la classification des substances.

La méthode utilise trois doses fixes suffisamment distinctes pour permettre la classification de la substance en fonction des résultats de l'étude. En outre, le protocole décrit permet de choisir trois doses supplémentaires qui peuvent être utilisées à certains stades de décision ou pour la poursuite de l'essai. L'utilisation d'une de ces doses supplémentaires peut être envisagée lorsqu'une analyse plus fine s'avère souhaitable ou nécessaire.

La méthode utilise des doses de départ définies; l'objectif n'est pas de calculer une DL_{50} précise, mais de déterminer une plage d'exposition susceptible d'entraîner la mort, puisque la mort d'une certaine proportion d'animaux reste le principal critère d'évaluation de cet essai. Les résultats de l'essai doivent permettre une classification selon les critères de l'annexe VI. Du fait de l'approche séquentielle, la durée de l'essai peut être supérieure à celle indiquée dans la méthode B.1. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle nécessite moins d'animaux que la méthode de toxicité (orale) aiguë (B.1) et que la méthode alternative de la dose fixe (B.1 bis).

Voir également l'introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Principe de la méthode d'essai

Une des doses prédéterminées de la substance est administrée oralement à un groupe d'animaux d'expérience. La substance est testée par étapes, chacune des étapes nécessitant trois animaux du même sexe. Il n'est pas nécessaire de procéder à une étude d'observation préliminaire. Selon qu'une mortalité liée à la substance est ou non constatée chez les animaux traités, l'essai se poursuivra comme suit:

- l'essai ne sera pas poursuivi,
- l'étape suivante sera réalisée à la même dose, mais sur des animaux de l'autre sexe,
- l'étape suivante sera réalisée à la dose immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure.

1.4. Description de la méthode d'essai

1.4.1. Préparation

Des animaux adultes jeunes et sains sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification et maintenus dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai, afin de leur permettre de s'acclimater aux conditions régnant dans le laboratoire. Les animaux peuvent être regroupés dans les cages par sexe et par dose, mais le nombre d'animaux par cage doit toujours permettre une observation aisée de chaque animal.

La substance à tester est administrée aux animaux en une seule fois, par gavage à l'aide d'une sonde œsophagienne ou d'une canule pour intubation appropriée.

Si nécessaire, la substance à tester est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Chaque fois que possible, on utilisera de préférence une solution/suspension aqueuse, ou sinon une solution/émulsion dans l'huile (par exemple, huile de maïs) ou éventuellement une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule utilisé n'est pas aqueux, ses caractéristiques toxiques doivent être connues ou être déterminées avant l'essai.

Les animaux sont mis à la diète avant l'administration de la substance (la veille au soir pour le rat et pendant 3-4 heures pour la souris), mais sans les priver d'eau.

1.4.2. Conditions de l'essai

1.4.2.1. Animaux d'expérience

Sauf indication contraire, le rat est l'espèce de prédilection en ce qui concerne les rongeurs. Les femelles doivent être nullipares et non gravides.

Au début de l'étude, l'écart de poids entre les animaux doit être minime et ne pas dépasser ± 20 pour cent du poids moyen pour chaque sexe.

1.4.2.2. Nombre et sexe

Trois animaux de même sexe sont utilisés pour chaque étape. Le choix du sexe est indifférent pour la première étape.

1.4.2.3. Doses

La dose de départ à utiliser est choisie parmi l'une des trois doses fixes, à savoir 25, 200 et 2 000 mg/kg de poids corporel. La dose de départ doit être celle qui est la plus susceptible d'entraîner la mort d'au moins certains des animaux traités. En fonction de la dose de départ, on pourra utiliser un des modes opératoires représentés sous forme de diagrammes à l'annexe I.

Pour sélectionner le sexe et la dose de départ, toutes les informations disponibles doivent être utilisées, y compris les données concernant la relation structure-activité. Lorsque les informations suggèrent qu'une mortalité est improbable à la dose la plus élevée (2 000 mg/kg p.c.), il y a lieu d'effectuer un essai de limite. En l'absence d'informations sur une substance à tester, il est recommandé, pour des motifs ayant trait au bien-être des animaux, d'utiliser la dose de départ de 200 mg/kg p.c.

Il peut être souhaitable d'obtenir des informations plus précises que celles fournies par l'essai aux trois doses fixes de 25, 200 et 2 000 mg/kg p.c. Dans ce cas, il est possible de poursuivre l'essai en utilisant des doses fixes supplémentaires de 5, 50 ou 500 mg/kg p.c.

Il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles entraîneront une souffrance et une détresse importantes, du fait des propriétés corrosives ou très irritantes de la substance.

Le laps de temps qui s'écoule entre le traitement des différents groupes est fonction de la date d'apparition, de la durée et de la gravité des signes de toxicité observés. Le traitement des animaux de l'autre sexe ou le traitement par la dose supérieure seront différés jusqu'à ce que l'on se soit assuré de la survie des animaux précédemment traités.

1.4.2.4. Essai limite

Il est possible d'effectuer un essai limite à la dose de 2 000 mg/kg p.c. sur trois animaux de chaque sexe. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut s'avérer nécessaire de poursuivre l'essai à la dose de 200 mg/kg p.c. (ou 500 mg/kg p.c.).

1.4.2.5. Période d'observation

Les animaux sont normalement observés pendant 14 jours, à moins qu'ils ne meurent avant ou qu'il ne soit nécessaire de les exclure de l'étude et de les sacrifier par euthanasie pour abrégier leurs souffrances. La durée de la période d'observation ne doit toutefois pas être fixée de façon rigide; elle doit être déterminée en fonction des effets toxiques, de leur date d'apparition et de la durée de la période de récupération, et peut donc être prolongée si nécessaire. Le moment où les signes de toxicité apparaissent et celui où ils disparaissent sont importants, en particulier si ces signes ont tendance à apparaître tardivement. Toutes les observations sont systématiquement consignées et une fiche individuelle est établie pour chaque animal.

1.4.3. Mode opératoire

Après la période de jeûne, les animaux sont pesés préalablement à l'administration de la substance. Une fois la substance administrée, les animaux peuvent être privés de nourriture pendant une nouvelle période de 3-4 heures. Lorsqu'une dose est administrée en plusieurs fois sur une période donnée, il peut être nécessaire, suivant la durée de cette période, de nourrir et d'abreuver les animaux.

Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Chez les rongeurs, ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel; toutefois, cette limite peut être portée à 2 ml/100 g de poids corporel dans le cas des solutions aqueuses. Pour minimiser la variabilité du volume d'essai, les concentrations doivent être adaptées de manière que toutes les doses soient administrées à volume constant. Si l'administration en une dose unique n'est pas possible, la dose peut être fractionnée en plusieurs prises sur une période ne dépassant pas 24 heures.

Le mode opératoire détaillé figure à l'annexe I.

1.4.3.1. Observation générale

Une observation clinique détaillée doit être effectuée à deux reprises au moins le jour de l'administration ou davantage si la réaction des animaux le nécessite, et au moins une fois par jour par la suite. Les animaux retrouvés à l'état moribond et ceux qui présentent des signes de souffrance et de détresse intenses et persistants doivent être euthanasiés. Les animaux sacrifiés pour ces motifs sont pris en compte de la même façon que les animaux qui succombent au cours de l'essai.

Lorsque des animaux sont sacrifiés pour des raisons humanitaires ou sont retrouvés morts, le moment de leur mort doit être noté aussi précisément que possible. Des observations complémentaires sont nécessaires si les animaux continuent de présenter des signes de toxicité. Ces observations doivent porter sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Il convient d'être particulièrement attentifs aux manifestations telles que tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma.

Toutes les observations sont systématiquement consignées, et une fiche individuelle est établie pour chaque animal.

1.4.3.2. Poids corporel

Tous les animaux doivent être pesés peu de temps avant l'administration de la substance à tester, et au moins une fois par semaine par la suite. Les variations du poids doivent être calculées et consignées. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés avant d'être euthanasiés.

1.4.3.3. Autopsie

Tous les animaux d'expérience, y compris ceux qui sont morts pendant l'essai ou qui ont été retirés de l'étude, sont soumis à une autopsie. Pour chaque animal, toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être consignées. Un examen microscopique des organes présentant des signes de pathologie à l'examen macroscopique peut être envisagé pour les animaux ayant survécu au minimum 24 heures, car il peut fournir des informations utiles.

2. RÉSULTATS

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou sacrifiés pour des raisons humanitaires, le moment de la mort de chaque animal, la description des effets toxiques, leur période d'apparition et leur évolution, ainsi que les résultats de l'autopsie.

Des indications générales concernant l'interprétation des résultats en vue de la classification figurent à l'annexe 2.

3. COMPTE RENDU

Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- espèce/souche,
- état des animaux, sur le plan microbiologique, si informations à ce sujet,
- nombre d'animaux, âge et sexe,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai, à intervalles d'une semaine par la suite et à la fin de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification du choix du véhicule si autre que de l'eau,
- détails concernant l'administration de la substance, y compris les volumes administrés et le moment de l'administration,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (type/origine, origine de l'eau),
- justification du choix de la dose de départ.

Résultats:

- tableaux des résultats par sexe et par dose pour chaque animal (à savoir les animaux présentant des signes d'intoxication, mortalité comprise; nature, gravité et durée des effets),
- date d'apparition des signes de toxicité, évolution dans le temps et réversibilité éventuelle,
- résultats de l'autopsie et le cas échéant de l'examen histopathologique, pour chaque animal.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES**

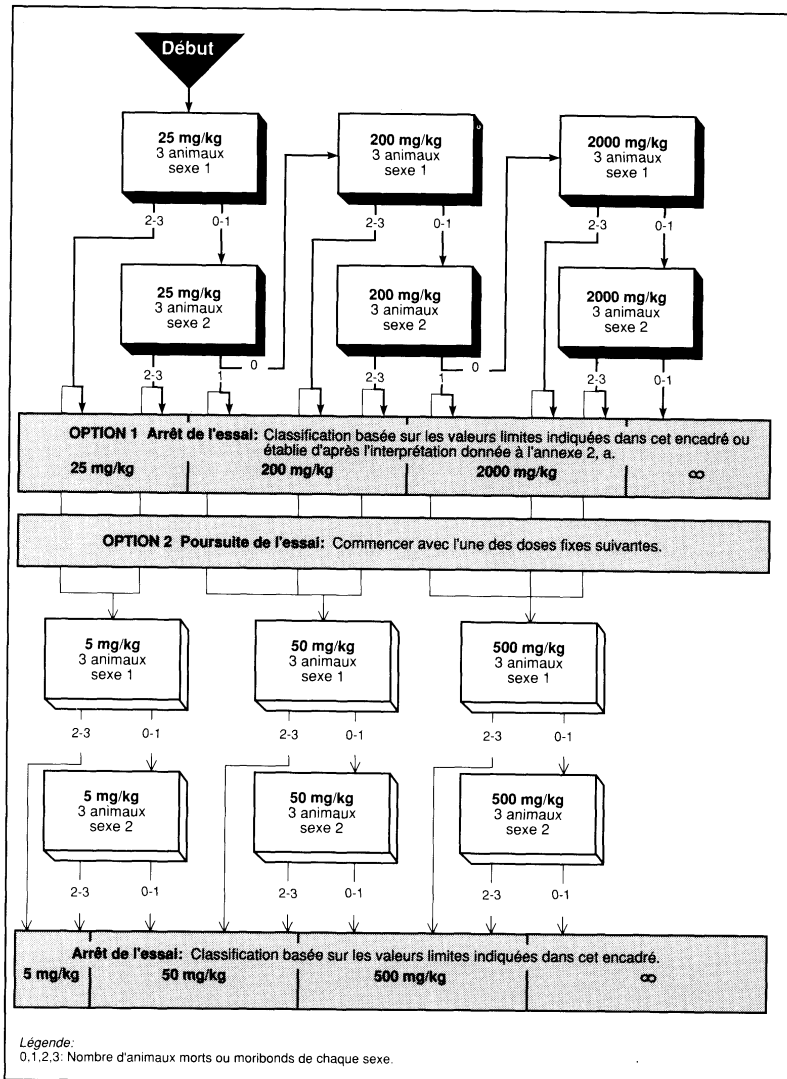
Cette méthode reprend la ligne directrice 423 de l'OCDE.

ANNEXE 1

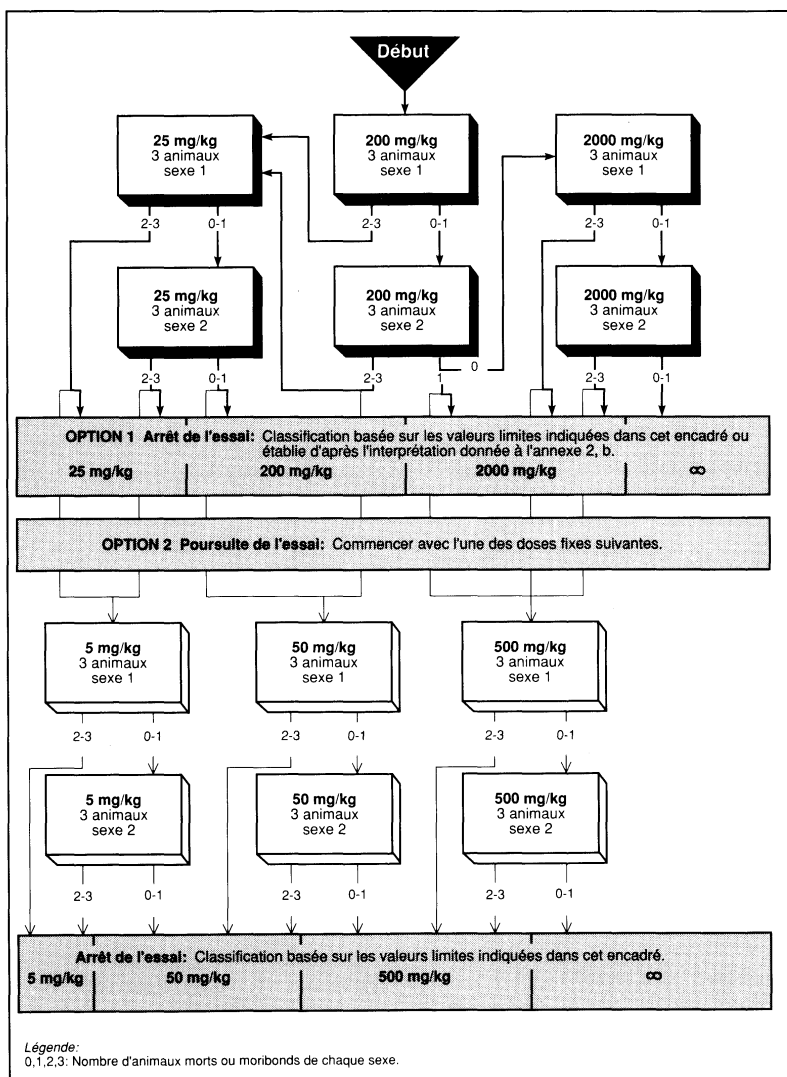
MODE OPÉRATOIRE

1. Comme indiqué au paragraphe 1.4.2.3, la dose de départ doit être la dose susceptible d'entraîner une mortalité chez au moins certains des animaux traités. Les informations pouvant servir à sélectionner cette dose de départ sont les suivantes:
 - données relatives aux propriétés physico-chimiques,
 - relation structure-activité,
 - toutes les données résultant des autres essais de toxicité,
 - usage prévu de la substance à tester.
2. Pour chaque dose de départ, la procédure à suivre est indiquée par le programme d'essai correspondant figurant dans la présente annexe. En fonction du nombre d'animaux morts ou sacrifiés selon une méthode humaine, la procédure à suivre est indiquée par des flèches.
3. Lorsque l'administration d'une dose de départ de 25 ou de 200 mg/kg de poids corporel entraîne la mort d'un seul animal de l'autre sexe, l'essai n'a normalement pas à être poursuivi. Toutefois, si aucun signe de toxicité n'est observé sur les cinq autres animaux, il convient, au moment de l'autopsie, d'envisager la possibilité que le décès n'ait pas été causé par la substance. Dans ce cas, l'essai doit être poursuivi en utilisant la dose immédiatement supérieure.
4. Si l'administration d'une dose de 2 000 mg/kg de poids corporel entraîne la mort d'un animal de chaque sexe, il est probable que la DL_{50} soit supérieure à 2 000 mg/kg p.c. Toutefois, dans la mesure où il s'agit d'un résultat limite, il convient d'observer attentivement la réaction des deux autres animaux de chaque sexe car l'apparition de signes nets et marqués d'intoxication chez ces animaux pourrait aboutir à une classification correspondant à une DL_{50} inférieure ou égale à 2 000 mg/kg p.c. ou justifier la poursuite de l'essai à cette même dose.
5. La procédure permet d'effectuer l'essai en utilisant trois doses fixes supplémentaires (option 2). Cette option peut être utilisée pour sélectionner une autre dose à un moment donné, ou pour poursuivre les essais une fois l'essai en question terminé (option 1). L'option 1 est indiquée par des flèches épaisses, l'option 2 par des flèches fines.

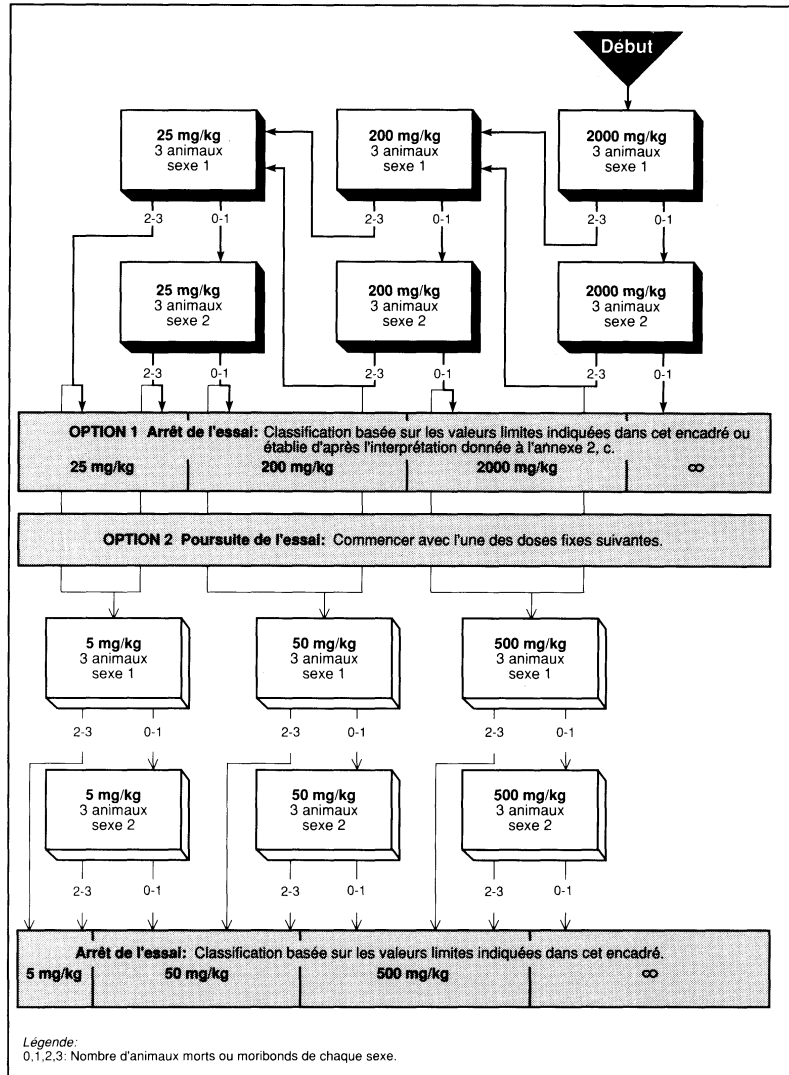
a) Procédure d'essai pour une dose de départ de 25 mg/kg p. c.



b) Procédure d'essai pour une dose de départ de 200 mg/kg p.c.



c) Procédure d'essai pour une dose de départ de 2 000 mg/kg p.c.



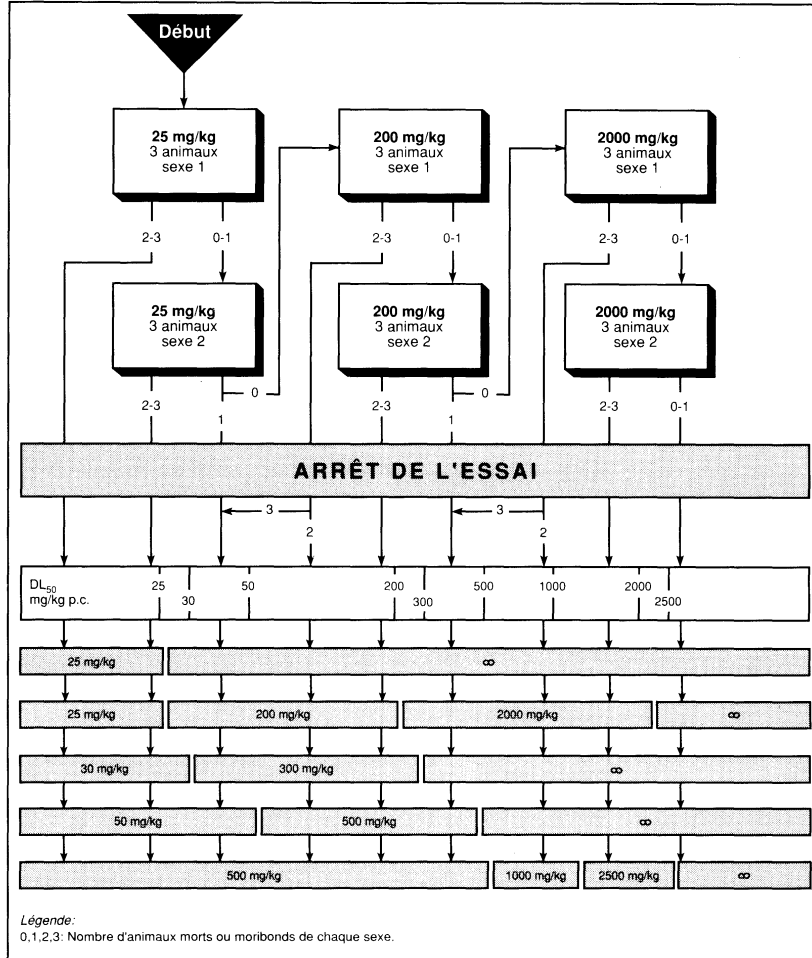
ANNEXE 2

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'APRÈS L'ESSAI OPTION 1

Les encadrés gris figurant sous l'encadré «Arrêt de l'essai» dans les diagrammes de la présente annexe représentent les valeurs limites servant à la classification. Selon la procédure indiquée pour l'option 1, il faut suivre la flèche appropriée jusqu'à l'encadré gris pertinent, dans le bas du diagramme.

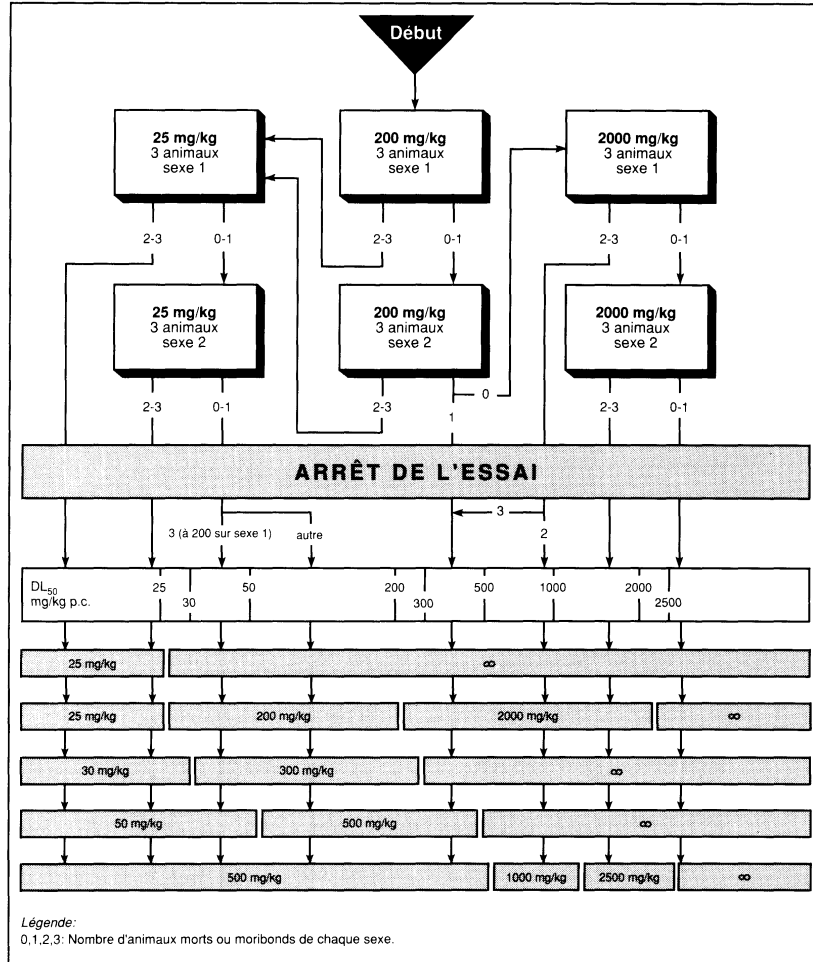
a) Interprétation des résultats d'après l'essai option 1

Dose de départ: 25 mg/kg de poids corporel



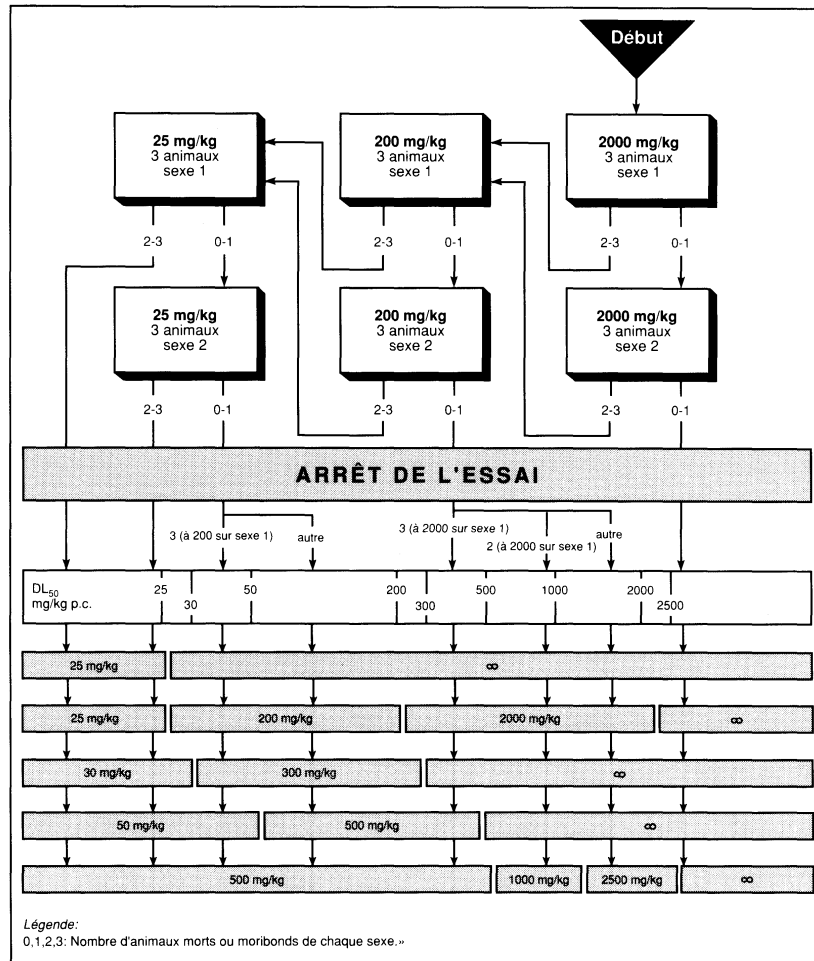
b) Interprétation des résultats d'après l'essai option 1

Dose de départ: 200 mg/kg de poids corporel



c) Interprétation des résultats d'après l'essai option 1

Dose de départ: 2 000 mg/kg de poids corporel



B.2. TOXICITÉ AIGUË (inhalation)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur la distribution de la taille des particules, la pression de vapeur, le point de fusion, le point d'ébullition, le point d'éclair et l'explosivité (le cas échéant) de la substance.

Voir également l'introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés à des concentrations croissantes de la substance à tester pendant une période déterminée, une seule concentration étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité dus à la substance. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

Si des animaux montrent des signes d'inconfort et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier peut entraîner une détresse ou des douleurs intenses du fait des propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expérience. Il n'est pas nécessaire de soumettre les animaux témoins à une exposition simulée, à moins que le dispositif d'exposition utilisé ne l'exige.

Il peut être nécessaire de microniser les substances solides à tester afin de les réduire en particules d'une taille appropriée.

On peut, au besoin, ajouter à la substance à tester un véhicule approprié en vue d'obtenir la concentration adéquate de celle-ci dans l'atmosphère; il faut alors prévoir un groupe témoin pour ce véhicule. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter l'administration, ils doivent être non toxiques et il est possible de s'appuyer pour cela sur des données bibliographiques appropriées.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix rongeurs au moins (cinq femelles et cinq mâles) sont utilisés pour chaque niveau de

concentration. Les femelles doivent être nullipares et non-gravides.

Note: Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux pour les tests de toxicité aiguë sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les concentrations doivent être soigneusement choisies, en multipliant les efforts visant à ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. Concentrations d'exposition

Les concentrations doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées correctement pour produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination acceptable de la CL50.

1.6.2.4. Essai de limite

Si une exposition de 5 mâles et de 5 femelles à une concentration de 20 milligrammes par litre d'un gaz ou 5 milligrammes par litre d'un aérosol ou de particules pendant 4 heures ou, lorsque cela n'est pas possible en raison des propriétés chimiques ou physiques, voire explosives, de la substance d'essai, une exposition à la concentration maximale possible ne cause la mort d'aucun animal en 14 jours, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. Temps d'exposition

La durée de l'exposition doit être de quatre heures.

1.6.2.6. Dispositif expérimental

Les animaux doivent être exposés à la substance au moyen d'un dispositif d'exposition dynamique capable de maintenir un courant d'air permettant au moins 12 renouvellements de l'atmosphère de l'enceinte d'exposition par heure, et assurant une teneur suffisante en oxygène ainsi qu'une répartition uniforme du produit à tester dans l'atmosphère de l'enceinte d'exposition. Si l'on utilise une chambre d'exposition, celle-ci doit être conçue de manière à éviter autant que possible l'entassement des animaux et à optimiser l'exposition par inhalation à la substance d'essai. En règle générale, pour assurer la stabilité de la composition de l'atmosphère d'une chambre, le «volume» total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai. On peut aussi avoir recours à un système d'exposition soit oro-nasal, soit de la tête seule, soit du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition présentent l'avantage de limiter la pénétration de la substance d'essai par d'autres voies.

1.6.2.7. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant, cette durée ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée si nécessaire. Le moment d'apparition ou de disparition des symptômes de toxicité ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de mortalité retardée.

1.6.3. Mode opératoire

Peu de temps avant l'exposition, les animaux sont pesés, puis exposés à la concentration d'essai dans l'appareillage décrit pendant une durée de quatre heures après stabilisation de la concentration dans la chambre. La stabilisation doit être rapide. La température à laquelle s'effectue l'essai doit être maintenue à $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$. L'idéal est de maintenir l'humidité relative entre 30 et 70 %, mais, dans certains cas (par exemple certains essais d'aérosols), cela peut être impossible. Le maintien d'une pression légèrement négative à l'intérieur de la chambre (5 mm d'eau) empêchera la substance d'essai de s'échapper dans le laboratoire. La nourriture et l'eau

doivent être retirées pendant l'exposition. Il convient d'utiliser un dispositif permettant de produire et de contrôler l'atmosphère d'essai. Le système doit permettre de créer des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible. La chambre doit être conçue et fonctionner de telle façon qu'il y soit maintenue une distribution homogène de la substance dans l'atmosphère.

Il convient de mesurer ou de surveiller:

a) le débit d'air (en permanence).

b) la concentration réelle de la substance d'essai. Elle doit être mesurée dans la zone de respiration au moins trois fois au cours de l'exposition (certaines atmosphères, comme les aérosols à forte concentration, peuvent nécessiter un contrôle plus fréquent). Pendant la période d'exposition, la concentration ne doit pas varier de plus de $\pm 15\%$ par rapport à la valeur moyenne. Toutefois, dans le cas de certains aérosols, ce degré de précision peut ne pas être obtenu et un écart plus grand est alors acceptable. En ce qui concerne les aérosols, la taille des particules doit être analysée aussi souvent que nécessaire (au moins une fois par groupe d'exposition).

c) la température et l'humidité, en permanence si possible.

Les observations ont lieu pendant et après l'exposition et sont enregistrées systématiquement; une fiche individuelle doit être établie pour chaque animal. Les observations doivent être fréquentes le premier jour. Un examen clinique attentif doit être pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en agissant de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple grâce à l'autopsie ou à la conservation au froid des animaux trouvés morts ainsi qu'en isolant et en sacrifiant des animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée à la respiration, aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. Le moment de la mort doit être noté avec autant de précision que possible. Le poids de chaque animal doit être déterminé chaque semaine après l'exposition ainsi qu'au moment de la mort.

Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés en recherchant en particulier toutes les modifications des voies respiratoires supérieures et inférieures. Toutes les modifications doivent être consignées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres symptômes de toxicité, la description des effets toxiques et les résultats de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et enregistré lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause de l'inconfort et des souffrances dus à la substance sont enregistrés en tant que morts dues à la substance. La CL50 doit être déterminée selon une méthode reconnue. L'évaluation des données doit inclure la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la gravité de toutes les anomalies, y compris les anomalies du comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les changements de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions de l'essai: description de l'appareillage d'exposition, y compris conception, type, dimensions, source d'air, système de génération produisant l'aérosol, méthode de conditionnement d'air et, le cas échéant, stabulation des animaux en chambre d'essai. Le dispositif de mesure de la température, de l'humidité, de la concentration des aérosols et de la distribution de la taille des particules doit être décrit.

Données relatives à l'exposition:

Elles doivent être présentées sous forme d'un tableau indiquant les valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart-type); elles devront, si possible, comprendre:

- a) débit d'air dans le dispositif d'inhalation,
- b) température et humidité de l'air,
- c) concentrations nominales (quantité totale de substance d'essai introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air),
- d) le cas échéant, nature du véhicule,
- e) concentrations réelles dans la zone de respiration,
- f) diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) et écart-type géométrique (ETG),
- g) durée de stabilisation,
- h) durée d'exposition.

- tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir, nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés),
- moment de la mort pendant ou après exposition, raisons et critères pour lesquels les animaux ont été euthanasiés,
- toutes les observations,
- valeur de la CL50 pour les animaux de chaque sexe, déterminée à la fin de la période d'observation (en précisant la méthode de calcul),
- intervalle de confiance de 95 % pour la CL50 (lorsque le calcul est possible),
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet),
- résultats d'autopsie,
- tous les résultats d'examens histopathologiques,
- discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur calculée de la CL50, les animaux euthanasiés au cours de l'essai),
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.3. TOXICITÉ AIGUË (cutanée)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des doses croissantes de la substance à tester sont appliquées sur la peau à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier entraîne une détresse ou des douleurs intenses du fait de ses propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expérience. Vingt-quatre heures environ avant l'épreuve, on tond ou l'on rase les poils de la région dorsale du tronc des animaux en évitant toute lésion de la peau susceptible de modifier sa perméabilité. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être suffisamment humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à assurer un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un véhicule, son influence sur la pénétration de la substance dans la peau doit être prise en considération. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

On peut utiliser des rats ou des lapins adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation. Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder, $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Cinq animaux au moins sont utilisés pour chaque dose. Ils doivent être de même sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non-gravides. Si l'on dispose d'informations qui montrent qu'un sexe est nettement plus sensible, les essais seront pratiqués sur des animaux de ce sexe.

Note: Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux lorsque les tests de toxicité aiguë sont effectués sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les doses doivent être soigneusement choisies, en s'efforçant au maximum de ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. Doses

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière à produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Tout effet irritant ou corrosif doit être pris en considération lors du choix des doses. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination acceptable de la DL50.

1.6.2.4. Essai «limite»

Un essai «limite» peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2 000 mg/kg de poids corporel au moins à un lot de 5 mâles et 5 femelles, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut être nécessaire de réaliser une étude complète.

1.6.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant sa durée ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent, leur durée ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de tendance à une mortalité retardée.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface traitée peut être moindre, mais la substance d'essai doit être appliquée de manière à former un film aussi mince et uniforme que possible.

Les substances d'essai doivent être maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant pendant une période de 24 heures. La partie traitée doit, en outre, être convenablement couverte, de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer cette dernière. On peut utiliser des appareils de contention pour empêcher les animaux d'ingérer la substance d'essai mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

A la fin de la période d'application, la substance d'essai résiduelle doit être éliminée, si possible, avec de l'eau, ou au moyen d'un autre procédé de nettoyage de la peau.

Les observations doivent être consignées systématiquement au fur et à mesure qu'elles sont effectuées, en établissant une fiche individuelle pour chaque animal. Les animaux doivent être observés fréquemment le premier jour. Un examen clinique attentif doit être pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en prenant des mesures de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple: autopsie ou conservation au froid des animaux trouvés morts ainsi qu'en isolant et sacrifiant les animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications des poils, de la peau traitée, des yeux, des muqueuses ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, et enfin de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées,

léthargie, sommeil et coma. Le moment de la mort doit être enregistré avec autant de précision que possible. Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

Estimation de la toxicité pour l'autre sexe

Après avoir mené à terme l'étude portant sur des animaux appartenant à un sexe, la substance est administrée au moins à un lot de 5 animaux de l'autre sexe, afin de déterminer si les animaux de ce sexe ne sont pas nettement plus sensibles à la substance à tester. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut être justifié dans des circonstances particulières. Si l'on dispose d'informations appropriées qui montrent que les animaux du sexe testé sont considérablement plus sensibles, on peut se dispenser d'effectuer des essais sur les animaux de l'autre sexe.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres signes d'intoxication, la description des effets toxiques et les résultats de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et noté peu de temps avant l'application de la substance d'essai, puis une fois par semaine et au moment de la mort; les modifications du poids doivent être calculées et enregistrées lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause des souffrances et de l'inconfort dus à la substance sont enregistrés comme s'ils étaient morts du fait du composé étudié. La DL50 doit être déterminée par application d'une méthode reconnue.

L'évaluation des données doit inclure une évaluation de la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la sévérité de toutes les anomalies, y compris les anomalies de comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les modifications de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales (y compris le procédé de nettoyage de la peau et le type de pansement: occlusif ou non),
- doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et des concentrations),
- sexe des animaux sur lesquels l'essai a été réalisé,
- tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir, nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés),
- moment de la mort après administration, raisons et critères justifiant l'euthanasie des animaux,
- toutes les observations,
- valeur de la DL50 pour le sexe soumis à une étude complète, déterminée à 14 jours (en précisant la méthode de calcul),
- intervalle de confiance de 95 % pour la DL50, lorsque le calcul est possible,
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet),
- résultats d'autopsie,
- toutes les constatations histopathologiques,
- résultats de tout essai réalisé sur l'autre sexe,
- discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur de la DL50 calculée les animaux euthanasiés au cours de l'essai),
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION
Voir introduction générale partie B (point D).

4. RÉFÉRENCES
Voir introduction générale partie B (point E).

B. 6 SENSIBILISATION CUTANÉE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Remarques:

La sensibilité des essais et leur capacité à détecter les substances susceptibles d'entraîner une sensibilisation cutanée chez l'homme sont des critères importants dans un système de classification de la toxicité établi à des fins de santé publique.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier de manière adéquate toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation cutanée pour l'homme et qui puisse être appliquée à toutes les substances.

Divers facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, y compris son pouvoir de pénétration cutanée, doivent être pris en considération lors du choix de l'essai.

Deux types d'essai utilisant des cobayes ont été développés: d'une part, les essais avec adjuvant dans lesquels l'état est potentialisé par la dissolution ou la mise en suspension dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF) de la substance à tester, et d'autre part les essais sans adjuvant.

Les essais avec adjuvant ont généralement un meilleur pouvoir prédictif du potentiel sensibilisant cutanée de la substance testée avec plus de précision que les méthodes qui n'utilisent pas l'adjuvant complet de Freund. C'est la raison pour laquelle leur utilisation est préférable.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GPMT: Guinea Pig Maximisation Test) est un essai avec adjuvant très répandu. Bien qu'il existe plusieurs autres méthodes pour détecter le potentiel de sensibilisation cutanée, le GPMT est l'essai avec adjuvant de prédilection.

Les essais sans adjuvant (l'essai de Buehler étant préférable) sont considérés comme moins sensibles vis-à-vis de nombreuses classes de produits chimiques.

Dans certains cas, l'essai de Buehler qui consiste en une application topique, peut s'avérer préférable à l'essai de maximalisation qui nécessite une injection intradermique. L'utilisation de l'essai de Buehler doit être scientifiquement justifiée.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GPMT) et l'essai de Buehler sont décrits dans cette méthode. D'autres méthodes peuvent être utilisées, à condition qu'elles soient correctement validées et que leur utilisation soit scientifiquement justifiée.

Si un résultat positif est obtenu dans un test de dépistage reconnu, une substance peut être considéré comme un sensibilisant potentiel et il peut ne pas être nécessaire de réaliser un essai complémentaire sur le cobaye. Cependant si un résultat négatif est obtenu dans un tel test de dépistage, un essai sur le cobaye doit être effectué en utilisant la procédure décrite dans la présente méthode d'essai.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée à une substance. Chez l'homme, la réaction peut se caractériser par un prurit, un érythème, un œdème, des vésicules, des bulles ou une association de ces manifestations. Dans les autres espèces, la réaction peut différer et prendre uniquement la forme d'un érythème ou d'un œdème.

Exposition d'induction: exposition expérimentale d'un sujet à une substance dans le but d'induire une hypersensibilité.

Période d'induction: période d'au moins une semaine consécutive à l'exposition d'induction, au cours de laquelle une hypersensibilité peut s'installer.

Exposition de déclenchement: exposition expérimentale, après période d'induction, d'un sujet préalablement exposé à la substance, dans le but de vérifier si le sujet présente une réaction d'hypersensibilité.

1.3. Substances de référence

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée doivent être vérifiées tous les six mois à l'aide de substances ayant des propriétés connues de sensibilisation cutanée faible à modérée.

Pour un essai conduit selon les règles, les substances faiblement ou moyennement sensibilisantes provoquent normalement une réaction d'au moins 30 % dans les méthodes avec adjuvant et 15 % dans les méthodes sans adjuvant.

Les substances suivantes seront de préférence utilisées:

Numéro CAS	Numéro EINECS	Dénomination EINECS	Dénomination usuelle
101-86-0	202-983-3	α -hexylcinnamaldéhyde	α -hexylcinnamaldéhyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazole-2-thiol (mercapto-benzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	nordcaïne

Dans certaines circonstances dûment justifiées, il est possible d'utiliser d'autres substances répondant aux critères ci-dessus.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Les animaux d'expérience sont dans un premier temps exposés à la substance à tester par une injection intradermique et/ou une application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire peut se produire, les animaux sont exposés à une dose de déclenchement. L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux sont alors comparées à celles de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu un placebo lors de l'induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

1.5. Description des méthodes d'essai

Si l'élimination de la substance à tester s'avère nécessaire, ceci doit être fait en utilisant de l'eau ou un solvant approprié afin de ne pas modifier la réaction existante ou l'intégrité de l'épiderme.

1.5.1. Essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT)

1.5.1.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont tondus, rasés ou épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.1.2. Conditions de l'essai

1.5.1.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.1.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 10 animaux et le lot témoin, au moins 5. Si le lot traité comprend moins de 20 animaux et le lot témoin moins de 10, et qu'il n'est pas possible de conclure que la substance à tester est un agent sensibilisant. Dans ce cas, il est fortement recommandé d'utiliser d'autres animaux afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux d'essai et 10 animaux témoins.

1.5.1.2.3. Doses

La concentration de substance utilisée pour chaque exposition d'induction doit être bien tolérée par l'organisme des animaux et doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux. À cet effet, il convient d'utiliser des animaux traités par l'adjuvant complet de Freund.

1.5.1.3. Mode opératoire

1.5.1.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont pratiquées dans la région scapulaire préalablement débarrassée de ses poils, de part et d'autre de la ligne médiane.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: la substance à tester dans un véhicule adéquat, à la concentration sélectionnée

Injection 3: la substance à tester à la concentration voulue, mélangée dans un rapport 1:1 (v/v) à de l'adjuvant complet de Freund ou du sérum physiologique.

Pour l'injection 3, les substances hydrosolubles sont dissoutes dans la phase aqueuse avant d'être mélangées avec l'adjuvant complet de Freund. Les substances liposolubles ou insolubles sont d'abord mises en suspension dans l'adjuvant complet de Freund, puis mises en phase aqueuse. La concentration finale de la substance à tester doit être égale à celle utilisée pour l'injection 2.

Les injections 1 et 2 sont pratiquées à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 est effectuée vers la partie caudale de la zone d'essai.

Jour 0 — lot témoin

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont réalisées aux mêmes endroits que chez les animaux traités.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: le véhicule non dilué

Injection 3: formulation à 50 % du véhicule dans un mélange 1:1 d'adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique.

5^{ème} — 7^{ème} jour — lot traité et lot témoin

Environ 24 heures avant l'application topique d'induction et si la substance ne provoque pas d'irritation cutanée, la zone d'essai rasée et/ou tondue est badigeonnée avec 0,5 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans de la vaseline, afin de créer une irritation locale.

6^{ème} — 8^{ème} jour — lot traité

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Un papier filtre (2 × 4 cm) imprégné de la substance dans le véhicule approprié est appliqué sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau à l'aide d'un pansement occlusif pendant 48 heures. Le choix du véhicule doit être justifié. Les substances solides sont réduites en poudre fine et incorporées dans un véhicule approprié; les substances liquides peuvent éventuellement être appliquées directement.

6^{ème} — 8^{ème} jour — lot témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué comme indiqué précédemment sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.2. Déclenchement

20^{ème} — 22^{ème} jour — lot traité et lot témoin

Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Un patch ou une cupule chargés de la substance à tester est appliquée sur un des flancs des animaux et, s'il y a lieu, un patch ou une cupule imprégnés uniquement du véhicule est appliquée sur l'autre flanc. Les pastilles sont maintenues en contact avec la peau pendant 24 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.3. Observation et cotation: lot traité et lot témoin

- Environ 21 heures après le retrait de la pastille, la zone étudiée est nettoyée et rasée et/ou tondue et épilée si nécessaire;
- 3 heures plus tard environ (à peu près 48 heures après le début de l'application de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;
- environ 24 heures après cette observation, on procède à une seconde observation (72 heures) et à une nouvelle cotation.

Il est recommandé de procéder à une lecture en aveugle chez les animaux traités et les animaux témoins.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement (c.-à-d. redéclenchement), si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement, doivent être observées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

1.5.2. Essai de Buehler

1.5.2.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont coupés, rasés ou éventuellement épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.2.2. Conditions de l'essai

1.5.2.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.2.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 20 animaux et le lot témoin, au moins 10.

1.5.2.2.3. Doses

Pour chaque exposition d'induction, la concentration de substance à utiliser est la concentration maximale entraînant une irritation modérée mais non excessive. Pour l'exposition de déclenchement, la concentration à utiliser est la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux.

Pour les substances hydrosolubles, il convient d'utiliser comme véhicule de l'eau ou une solution diluée non irritante de surfactant. Pour les autres substances, il est préférable d'utiliser un mélange d'éthanol à 80 % dans de l'eau pour l'induction, et de l'acétone pour le déclenchement.

1.5.2.3. Mode opératoire

1.5.2.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Un des flancs des animaux est rasé. La compresse servant à réaliser le test est imprégnée de la substance à tester incorporée dans un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; les substances liquides peuvent au besoin être appliquées directement). La compresse est appliquée sur la zone d'essai et maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié.

Le système doit être occlusif. Un tampon de ouate rond ou carré de 4 à 6 cm² convient. Il est préférable d'utiliser un dispositif de contention approprié pour garantir l'occlusion. Si l'on utilise des bandages, des expositions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires.

Jour 0 — lot témoin

Un des flancs des animaux est rasé. Le véhicule seul est appliqué de la façon décrite pour les animaux traités. La compresse servant à réaliser le test est maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié. S'il peut être prouvé qu'il n'est pas nécessaire de simuler le traitement sur le lot témoin, cette étape peut être omise, un contrôle ne recevant rien peut être utilisé.

6^{ème} — 8^{ème} jour et 13^{ème} — 15^{ème} jour — lot traité et lot témoin

La même application que celle décrite au jour 0 est réalisée sur la même zone (débarassée de ses poils si nécessaire) du même flanc au 6^{ème} — 8^{ème} jour, puis à nouveau au 13^{ème} — 15^{ème} jour.

1.5.2.3.2. Déclenchement

27^{ème} — 29^{ème} jour — lot traité et lot témoin

Le flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin est rasé. Une compresse occlusive ou une cupule contenant la quantité appropriée de la substance à tester, à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation, est appliquée sur la partie postérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin.

S'il y a lieu, on appliquera également une compresse occlusive ou une cupule ne contenant que le véhicule sur la partie antérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin. Les compresses ou cupules sont maintenues en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 6 heures.

1.5.2.3.3. Observations et cotation

- Environ 21 heures après le retrait de la compresse, la zone d'essai est débarrassée de ses poils;
- environ trois heures plus tard (à peu près 30 heures après le début de l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;
- environ 24 heures après cette observation (soit environ 54 heures après l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est à nouveau observée et cotée.

Il est recommandé d'effectuer une lecture en aveugle de la réaction dans le lot traité et le lot témoin.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement, si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement (c.-à-d. de redéclenchement), doivent être consignées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

2. RÉSULTATS (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)

Les résultats sont récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal, la réaction cutanée lors de chaque observation.

3. **COMPTE RENDU (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Lorsqu'un test de dépistage (p. ex. essai local sur ganglions lymphatiques (LLNA), essai de gonflement de l'oreille de souris (MEST)), est effectué préalablement à l'essai sur le cobaye, il convient d'en fournir la description ou la référence, ainsi que les détails du mode opératoire et les résultats obtenus avec la substance à tester et les substances de référence.

Procès-verbal d'essai (GMPT et essai de Buehler)

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- souche de cobayes utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- technique de préparation du site d'application,
- détails sur les matériaux utilisés pour l'application et la technique d'application,
- résultats de l'étude pilote et conclusions concernant les concentrations d'induction et de déclenchement à utiliser dans l'essai,
- détails concernant la préparation, l'application et l'élimination de la substance à tester,
- justification du choix du véhicule,
- concentrations du véhicule et de la substance à tester utilisées pour les expositions d'induction et de déclenchement, et quantité totale de substance appliquée pour l'induction et le déclenchement.

Résultats:

- résumé des résultats du dernier contrôle de sensibilité et de fiabilité (voir 1.3), y compris informations sur la substance, la concentration et le véhicule utilisés,
- toute observation effectuée sur chaque animal, cotations comprises,
- description de la nature et de la gravité des effets observés,
- toute observation histopathologique.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 406 de l'OCDE.

Appendice

TABLEAU

échelle de Magnusson et Kligman pour la cotation des réactions cutanées à une exposition de déclenchement

- 0 = pas de modification apparente
 - 1 = érythème discret ou localisé
 - 2 = érythème modéré et confluent
 - 3 = érythème intense avec gonflement
-

B.7 TOXICITÉ (ORALE) PAR ADMINISTRATION RÉPÉTÉE (28 JOURS)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée quotidiennement, par voie orale, à doses croissantes, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par lot pendant 28 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement chaque jour pour déceler les éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'expérience ainsi que ceux qui survivent jusqu'à la fin de l'essai sont autopsiés.

Cette méthode insiste davantage sur les effets neurologiques; les observations cliniques doivent être effectuées avec grand soin pour obtenir le maximum d'informations possible. La méthode vise à identifier les produits chimiques ayant un potentiel neurotoxique qui pourrait nécessiter des études plus approfondies. En outre, cette méthode peut fournir des indications sur les effets immunologiques et sur la toxicité de la substance pour les organes de la reproduction.

1.4. Description de la méthode d'essai

1.4.1. Préparation

De jeunes animaux adultes, sains, sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Les cages seront disposées de façon à minimiser les éventuels effets dus à l'emplacement des cages. Les animaux sont identifiés individuellement et maintenus dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, pour leur permettre de s'acclimater aux conditions régnant dans le laboratoire.

La substance à tester est administrée par gavage ou dans l'alimentation ou l'eau de boisson. La méthode d'administration orale dépend du but de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance.

Si nécessaire, la substance à tester est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Chaque fois que possible, on utilisera plutôt une solution/suspension aqueuse, ou sinon une solution/émulsion huileuse (par exemple huile de maïs) et en dernier lieu d'autres véhicules. Si le véhicule utilisé n'est pas de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues. Il convient de déterminer la stabilité de la substance à tester dans le véhicule.

1.4.2. Conditions de l'essai

1.4.2.1. Animaux d'expérience

Les expériences sont de préférence effectuées sur le rat, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. Les animaux adultes jeunes et sains sont issus de souches couramment utilisées en laboratoires. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration de la substance doit débuter le plus tôt possible après le sevrage, et dans tous les cas, avant que les animaux aient atteint l'âge de neuf semaines.

Au début de l'étude, l'écart de poids entre les animaux doit être minime et ne doit pas dépasser - 20 % du poids moyen de chaque sexe.

Lorsqu'une étude par administration orale répétée est effectuée préalablement à une étude à long terme, il est préférable d'utiliser des animaux de même souche et de même origine pour les deux études.

1.4.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (5 femelles et 5 mâles) sont utilisés pour chaque dose. Si le protocole expérimental prévoit des sacrifices en cours d'étude, le nombre d'animaux doit être augmenté du nombre de sacrifices prévus.

En outre, un lot satellite de 10 animaux (cinq de chaque sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et placé en observation pendant 14 jours après l'arrêt du traitement pour

étudier la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques. Un lot satellite de 10 animaux témoins est également utilisé.

1.4.2.3. Niveau des doses

On utilise en général au moins trois lots d'essai et un lot témoin. A l'exception de la substance à tester, les animaux du lot témoin reçoivent le même traitement que les animaux des lots traités. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance à tester, le volume maximal de ce véhicule sera administré au lot témoin.

S'il ressort de l'évaluation d'autres données que l'administration d'une dose de 1 000 mg/kg./j ne devrait pas entraîner d'effets, il est possible d'effectuer un essai de limite. En l'absence de données pertinentes, on peut procéder à une étude exploratoire pour aider à déterminer les doses à utiliser.

Les doses doivent être choisies en tenant compte de toutes les données disponibles concernant la toxicité et les aspects toxico-cinétiques de la substance à tester ou des substances de structure analogue. La dose la plus élevée doit produire des effets toxiques sans entraîner la mort ni des souffrances intenses. Une série de doses décroissantes est ensuite choisie, dans le but de mettre en évidence une relation entre la réaction et la dose administrée et d'objectiver une absence d'effets adverses à la dose la plus faible (dose sans effet adverse observé). L'écart optimal entre deux doses est souvent un facteur 2 à 4; il est préférable de prévoir une quatrième dose plutôt que d'avoir un écart excessif entre deux doses (plus qu'un facteur 10).

Pour les substances qui sont administrées dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson, il est important de vérifier que les quantités de substance d'essai administrées n'interfèrent pas sur la nutrition normale et l'équilibre hydrique. Si la substance est administrée dans l'alimentation, on peut utiliser une concentration alimentaire constante (ppm) ou une dose constante par rapport au poids de l'animal; la solution choisie doit être précisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à heure fixe et si nécessaire ajustée pour rester constante par rapport au poids de l'animal.

Lorsqu'une étude par administration orale répétée est effectuée préalablement à une étude à long terme, le régime alimentaire doit être identique dans les deux études.

1.4.2.4. Essai limite

Lorsqu'un essai réalisé selon les méthodes décrites dans la présente étude, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg poids corporel/jour, ou en cas d'administration dans l'alimentation ou l'eau de boisson, à une concentration équivalente (en fonction du poids corporel), ne produit pas d'effets toxiques observables et que les données relatives à des substances de structure apparentée ne laissent pas présumer une toxicité, il peut s'avérer inutile d'effectuer une étude complète sur trois doses. Dans ce cas, un essai limite se justifie, sauf si l'exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.4.2.5. Période d'observation

La période d'observation dure 28 jours. Les animaux des lots satellites prévus pour des observations complémentaires seront maintenus en observation, sans aucun traitement, pendant 14 jours supplémentaires au moins, afin de détecter l'apparition retardée, la persistance ou la réversibilité des effets toxiques.

1.4.3. Mode opératoire

La substance à tester est administrée aux animaux sept jours sur sept pendant 28 jours. Si la substance n'est administrée qu'à raison de cinq jours par semaine, ce choix doit être justifié. En cas d'administration par gavage, la dose doit être administrée en une fois à l'aide d'une sonde oesophagienne ou d'une canule à intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, mais peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel lorsqu'il s'agit de solutions aqueuses. Sauf en ce qui concerne les substances irritantes ou corrosives pour lesquelles une augmentation de la concentration entraînerait des effets exacerbés, la variabilité des volumes d'essai doit être minimisée par un ajustement des concentrations, afin que le volume

reste constant quelle que soit la dose.

1.4.3.1. Observation générale

L'observation clinique générale doit être effectuée au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en fonction de la période post-administration où les effets sont les plus marqués. L'état de santé des animaux doit être consigné. Au moins deux fois par jour, tous les animaux sont examinés pour déterminer la morbidité et la mortalité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intenses sont immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Tous les animaux sont soumis à une observation clinique détaillée une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même sujet) et au moins une fois par semaine par la suite. Ces observations doivent être effectuées sur les animaux sortis de leur cage et placés dans une enceinte standard, et doivent de préférence avoir lieu toujours au même moment. Les observations doivent être soigneusement consignées, de préférence à l'aide de systèmes de notation explicitement définis par le laboratoire d'essai. Il convient de veiller à ce que les conditions expérimentales varient le moins possible, il est souhaitable que les personnes qui effectuent les observations ne soient pas informées du traitement administré. Les observations doivent porter, entre autres, sur les modifications de la peau, du poil, des yeux, des muqueuses, des sécrétions et excréments et de l'activité autonome (par exemple larmolement, hérissément du poil, respiration inhabituelle). Il convient également de noter tout changement de comportement, de posture ou de réaction à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, animaux qui tournent en rond de façon répétitive) ainsi que tout comportement bizarre (auto-mutilation, marche à reculons).

Au cours de la quatrième semaine d'exposition, la réactivité aux différents stimuli sensoriels (auditifs, visuels et proprioceptifs), ainsi que la force de préhension et l'activité motrice sont évaluées. Les méthodes utilisables à cet effet sont détaillées dans les publications de référence (voir introduction générale, partie B).

Les observations fonctionnelles de la quatrième semaine d'exposition peuvent être omises si l'étude est effectuée préalablement à une étude subchronique (sur 90 jours). Dans ce cas, les observations fonctionnelles doivent faire partie de l'étude complémentaire. En revanche, l'existence de données résultant des observations fonctionnelles effectuées lors de l'étude préliminaire par administration répétée peut faciliter le choix des doses pour l'étude subchronique complémentaire.

Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent également être omises pour les lots qui montrent des signes de toxicité tels que les examens fonctionnels perdraient de leur valeur.

1.4.3.2. Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. La consommation d'aliments et d'eau doit être mesurée au minimum une fois par semaine. Si la substance est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit également être mesurée une fois par semaine au minimum.

1.4.3.3. Hématologie

Les examens hématologiques suivants doivent être réalisés à la fin de la période d'essai: hémocrite, concentration en hémoglobine, numération des hématies et des leucocytes et formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps/potential de coagulation. Les échantillons de sang doivent être prélevés en un point déterminé, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux, et conservés dans des conditions appropriées.

1.4.3.4. Biochimie clinique

Des analyses biochimiques cliniques visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus et en particulier sur le foie et les reins doivent être effectuées sur les échantillons de sang prélevés sur tous les animaux juste avant ou pendant le sacrifice (à l'exception des animaux retrouvés moribonds ou sacrifiés en cours d'essai). Il est préférable que les animaux soient à jeun

depuis la veille (1). Ces déterminations effectuées dans le sérum ou le plasma concernent notamment le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, le créatinine, les protéines totales et l'albumine, et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma-glutamyl transpeptidase et la sorbitol-deshydrogénase). La détermination d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) ainsi que des acides biliaires peut dans certains cas fournir des informations utiles.

(1) Pour un certain nombre de déterminations dans le sérum et le plasma, et principalement pour celle du glucose, il est préférable que les animaux soient à jeun depuis la veille. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer les effets les plus subtils et 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 la substance à tester. Si les prélèvements sont réalisés à jeun, les déterminations doivent être effectuées après les observations fonctionnelles de la quatrième semaine.

Éventuellement, des analyses d'urine peuvent être effectuées au cours de la dernière semaine de l'étude, comprenant un recueil du volume urinaire en un temps donné: aspect, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, de sang ou de cellules sanguines.

En outre, des études portant sur les marqueurs sériques des lésions tissulaires doivent être considérées. Les autres déterminations éventuellement nécessaires lorsque les propriétés de la substance à tester sont susceptibles de modifier les profils métaboliques concernant le calcium, le phosphate, les triglycérides à jeun, les hormones spécifiques, le méthémoglobine et la cholinestérase. Ces analyses devront être effectuées systématiquement pour les substances appartenant à certaines classes et au cas par cas pour les autres.

Dans l'ensemble, la démarche adoptée doit être souple et pouvoir être adaptée en fonction de l'espèce utilisée et des effets observés et/ou prévisibles de la substance considérée.

Si les données historiques de base recueillies antérieurement sont insuffisantes, les paramètres hématologiques et biochimiques devront être déterminés avant le début de l'expérience.

1.4.3.5. Autopsie

Tous les animaux de l'étude doivent faire l'objet d'une autopsie détaillée comportant un examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, le thymus, la rate, le cerveau et le coeur de tous les animaux seront débarrassés de tous les tissus adhérents et pesés le plus rapidement possible pour éviter le dessèchement.

Les tissus ci-après seront conservés dans le milieu de fixation le plus approprié en fonction du type de tissu et des examens histopathologiques prévus: tout tissu présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (régions représentatives: cerveau, cervelet et protubérance annulaire), la moelle épinière, l'estomac, le colon et l'intestin grêle (y compris plaques de Peyer), le foie, les reins, les surrénales, la rate, le coeur, le thymus, la thyroïde, la trachée et les poumons (conservés par insufflation d'un fixateur et immersion), les gonades, les organes génitaux annexes (par exemple: utérus, prostate), la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion sur le trajet de la voie d'administration et un autre à distance pour couvrir les effets systématiques), nerfs périphériques (sciatique ou tibial) de préférence très près du muscle, et une coupe de moelle osseuse (ou lame fraîchement montée de moelle recueillie par aspiration). En fonction des observations cliniques et des autres résultats, il peut s'avérer nécessaire d'examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme organes cibles potentiels du fait des propriétés de la substance doivent également être conservés.

1.4.3.6. Examen histopathologique

Pour tous les animaux du lot témoin et du lot traité à la dose la plus élevée, il est pratiqué un examen histopathologique complet des organes et tissus conservés. Cet examen devra être

pratiqué pour tous les lots exposés à des doses inférieures si des modifications induites par la substance à tester sont observées chez les animaux du lot traité à la dose la plus élevée.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Lorsqu'un lot satellite est utilisé, un examen histopathologique doit être pratiqué sur les organes et tissus sur lesquels des effets ont été observés dans les lots traités.

2. RÉSULTATS

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou sacrifiés pour des raisons humanitaires, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité ainsi qu'une description de ces signes, le moment d'apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, le type de lésion et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion.

Si possible, les résultats numériques seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée et reconnue. La méthode statistique doit être choisie lors de la conception de l'étude.

3. COMPTE RENDU

Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les informations suivantes:

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre d'animaux, âge et sexe,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai, à intervalles d'une semaine par la suite et à la fin de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification du choix du véhicule si autre que de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- détails concernant la formulation/préparation de la substance, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- détails concernant l'administration de la substance,
- le cas échéant, conversion de la concentration de la substance dans la ration alimentaire/l'eau de boisson (ppm) en dose effective (mg/kg p.c./jour),
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau.

Résultats:

- poids corporel/modifications du poids corporel,
- consommation d'aliments et, le cas échéant, consommation d'eau,
- réponse toxique par sexe et par dose, signes de toxicité compris,
- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- évaluation de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice,
- tests hématologiques et valeurs de référence applicables,
- tests de biochimie clinique et valeurs de référence applicables,
- poids corporel au moment du sacrifice et poids des organes,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats de l'examen histopathologique,
- données relatives à l'absorption si disponibles,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusions

4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 407 de l'OCDE.

B.8. TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (INHALATION)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur la distribution de la taille des particules, la pression de vapeur, le point de fusion, le point d'ébullition, le point d'éclair et l'explosivité (si applicables) de la substance.

Voir également l'introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés quotidiennement, pendant une période déterminée, à des concentrations croissantes de la substance à tester, une seule concentration étant utilisée par lot et ce, pendant une durée de 28 jours. Lorsqu'on utilise un véhicule en vue d'obtenir une concentration adéquate de la substance d'essai dans l'atmosphère, il y a lieu de prévoir un lot témoin pour le véhicule. Durant la période d'administration, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience sont autopsiés de même que ceux qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au moins pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots requis. Au besoin un véhicule approprié peut être utilisé pour obtenir une concentration adéquate de substance dans l'atmosphère. Si l'on utilise un véhicule ou un autre additif pour faciliter l'administration, celui-ci doit être réputé non toxique et cela peut être étayé par des données publiées, si nécessaire.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce utilisée de préférence. Il faut utiliser des animaux jeunes et sains d'une souche courante d'animaux de laboratoire.

Au début de l'expérience, l'intervalle de variation de poids entre les animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles) sont utilisés pour chaque lot. Les femelles doivent être nullipares et non-gravidés. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. De plus, un lot satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent

l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. Concentration d'exposition

On utilise au moins trois concentrations ainsi qu'un témoin ou un lot témoin pour le véhicule (correspondant à la concentration de véhicule présente dans l'atmosphère inhalé par le groupe de traitement le plus élevé). Excepté l'exposition à la substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les sujets des lots d'expérience. La concentration la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La concentration la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation concernant l'exposition de l'homme, la concentration la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la concentration intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs concentrations intermédiaires, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots à concentrations faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minimale pour que l'évaluation des résultats soit valable.

1.6.2.4. Durée d'exposition

L'exposition quotidienne doit être de 6 heures, mais d'autres durées peuvent se révéler nécessaires pour répondre à certaines exigences particulières.

1.6.2.5. Dispositif expérimental

Les animaux doivent être exposés à la substance d'essai au moyen d'un dispositif d'exposition dynamique capable de maintenir un flux d'air continu permettant au moins 12 renouvellements de l'atmosphère de l'enceinte d'exposition par heure, et assurant une teneur en oxygène suffisante et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Si l'on utilise une chambre d'exposition, celle-ci doit être conçue de manière à éviter autant que possible l'entassement des animaux et à optimiser l'exposition par inhalation à la substance d'essai. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre, le «volume» total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai. On peut aussi avoir recours à un système d'exposition soit oro-nasal, soit de la tête seule, soit du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition présentent l'avantage de limiter la pénétration de la substance d'essai par d'autres voies.

1.6.2.6. Période d'observation

Les animaux d'expérience devront être observés quotidiennement, en vue de déceler les symptômes de toxicité, durant toute la période de traitement et de récupération. Le moment de la mort ainsi que celui auquel les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent doivent être notés.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux sont quotidiennement exposés à la substance à tester à raison de 5 à 7 jours par semaine pendant une période de 28 jours. Les animaux de tout groupe satellite destiné à des observations de réversibilité d'effet doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de déceler la régression ou la persistance des effets toxiques. La température à laquelle s'effectue l'essai doit être maintenue à $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$.

Dans les conditions idéales, l'humidité relative doit être maintenue entre 30 et 70 % mais, dans certains cas, cela peut se révéler impossible (par exemple, essai de certains aérosols). Le maintien d'une pression légèrement négative à l'intérieur de la chambre ($\leq 5\text{ mm d'eau}$) empêchera la fuite de substance d'essai vers l'extérieur. La nourriture et l'eau doivent être retirées

pendant l'exposition.

Il y a lieu d'utiliser un système d'inhalation qui fonctionne dans des conditions dynamiques comportant un dispositif approprié de contrôle analytique de la concentration. Pour établir les concentrations d'exposition appropriées, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Le débit devra être réglé ajusté pour assurer des concentrations homogènes dans toute la chambre. Le système doit permettre d'obtenir des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible.

Il y a lieu de mesurer ou de contrôler:

a) le débit d'air (en permanence).

b) la concentration réelle de la substance d'essai. Elle doit être mesurée dans la zone de respiration; pendant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne doit pas varier de plus de $\pm 15\%$ par rapport à la valeur moyenne. Toutefois, dans le cas de certains aérosols, ce degré de contrôle peut ne pas être obtenu et un écart plus grand est alors acceptable. Durant toute la durée de l'étude, il faut garder les concentrations aussi constantes que possible d'un jour à l'autre. En ce qui concerne les aérosols, la taille des particules doit être analysée au moins une fois par semaine pour chaque groupe d'exposition.

c) la température et l'humidité, en permanence si possible.

Les observations ont lieu pendant et après l'exposition et sont notées systématiquement; une fiche individuelle doit être établie pour chaque animal. Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité, y compris leur moment d'apparition, leur intensité et leur durée doivent être enregistrés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Les animaux sont pesés toutes les semaines. Il est aussi recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que, dans la mesure du possible, ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur au cours des remises en cage. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants, appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux trouvés moribonds ou dans un état de détresse ou de douleur intenses au cours de l'essai doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;

2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales: alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique) aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo oxalo-acétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

Les autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine et l'activité cholinestérasique.

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.3.1. Autopsie

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie macroscopique. Au moins le foie, les reins, les glandes surrénales, les poumons et les testicules doivent être pesés à l'état

humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Organes et tissus (système respiratoire, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, coeur et tout autre organe présentant des lésions macroscopiques ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue éventuels d'examens histopathologiques ultérieurs. Les poumons doivent être prélevés entiers, pesés et traités au moyen d'un fixateur approprié permettant de conserver la structure pulmonaire intacte.

1.6.3.2. Examen histopathologique

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le(s) lot(s) témoin(s), il faut pratiquer un examen histologique systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions induites par la substance à tester au niveau à la dose la plus élevée, devront être examinés dans tous les lots exposés à toutes les doses inférieures. Les animaux de tout lot satellite devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les autres lots traités.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions de l'essai:

Description du dispositif d'inhalation, y compris conception, type, dimensions, source d'air, système de génération d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'atmosphère rejetée hors de l'enceinte et, le cas échéant, modalités d'hébergement des animaux en chambre d'essai. L'équipement de mesure de température, d'humidité et, s'il y a lieu, de la stabilité des concentrations des aérosols ou de la distribution de taille des particules doit être décrit.

Données relatives à l'exposition:

elles doivent être représentées sous la forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple, écart type); elles doivent, si possible, inclure:

- a) les débits d'air dans le dispositif d'inhalation,
 - b) la température et l'humidité de l'air,
 - c) les concentrations nominales (quantité totale de substance d'essai introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air),
 - d) le cas échéant, nature du véhicule,
 - e) concentrations réelles dans la zone de respiration,
 - f) le diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) et l'écart-type géométrique (ETG),
- données concernant la réponse toxique par sexe et par concentration,
 - moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience,
 - description des effets toxiques ou autres; concentration sans effet,
 - moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,
 - données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel,
 - examens hématologiques pratiqués et résultats complets,
 - examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets,

- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.9. TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est appliquée quotidiennement, à doses croissantes, sur la peau de plusieurs lots d'animaux d'expérience pendant une période déterminée, à raison d'une seule dose par lot, pendant une durée de 28 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience ainsi que ceux qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience sont autopsiés.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots témoins et traités. Peu de temps avant l'essai, on tond la région dorsale du tronc des animaux. On peut avoir recours au rasage mais, dans ce cas, l'opération doit être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est en général nécessaire de répéter les opérations de tonte ou de rasage à des intervalles d'une semaine environ, en évitant toute lésion de la peau. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal doit être pris en considération pour décider de la taille de la zone à épiler, et de la dimension de la surface à traiter. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

On peut utiliser des rats, des lapins ou des cobayes adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation.

Au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder \pm 20 % de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles), à la peau saine, sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non-gravidés. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. De plus, un lot satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut

être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. Doses

On utilise au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin traité avec le véhicule. La période d'exposition devra être d'au moins 6 heures par jour. La substance à tester doit être appliquée chaque jour au même moment et les quantités à administrer doivent faire l'objet d'une adaptation régulière (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux. Excepté l'administration de substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les animaux des lots d'expérience. Lorsqu'un véhicule est utilisé pour faciliter l'administration, celui-ci sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions qu'aux lots traités et la quantité de véhicule correspondra à celle reçue par le groupe traité avec la dose de substance d'essai la plus élevée. La dose la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation concernant l'exposition de l'homme, la dose la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la concentration intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs concentrations intermédiaires, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots recevant les doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minimale pour que l'évaluation des résultats soit valable.

Si l'application de la substance d'essai provoque une irritation cutanée grave, les concentrations doivent être réduites, ce qui peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. De plus, si les lésions cutanées sont très graves, il peut se révéler nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.2.4. Essai «limite»

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg de poids corporel ou avec une dose plus élevée en fonction de l'exposition possible pour l'homme, n'a provoqué aucun effet toxique, il peut s'avérer inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. Période d'observation

Les animaux d'expérience doivent faire l'objet d'une observation quotidienne afin de déceler les symptômes d'intoxication. Le moment où les symptômes d'intoxication apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort doivent être consignés.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7, pendant une période de 28 jours. Les animaux de tous les lots satellites destinés à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de constater la régression ou la persistance des effets toxiques. La durée de l'exposition doit être au moins de 6 heures par jour. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface représentant environ 10 % de la surface corporelle totale mais lorsqu'il s'agit de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être réduite. La couche de substance doit être aussi mince et uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'une

compresse de gaze poreuse et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée doit, en outre, être convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et de manière à éviter que les animaux puissent ingérer la substance à tester. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée. Il est également possible d'utiliser la technique du «collier de protection».

A l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer la substance résiduelle avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être notés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Les animaux doivent être pesés chaque semaine. Il est également recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire des animaux. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que, dans la mesure du possible, ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus au cours des remises en cages. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux moribonds et les animaux dans un état de détresse ou de douleur intenses doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;
2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales: alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique), aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutano oxalo-acétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

D'autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique.

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.4. Autopsie

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie macroscopique. Au moins le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Organes et tissus, à savoir, peau normale et traitée, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, coeur et les organes-cibles (c'est-à-dire ceux qui présentent des lésions importantes ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs.

1.6.5. Examen histopathologique

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le lot témoin, il faut pratiquer un examen histologique systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions attribuables à la substance à tester à la dose la plus élevée devront être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux de tout

lot satellite devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les lots traités.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

- données concernant les animaux (espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.),
- conditions de l'essai, (y compris le type de pansement: occlusif ou non-occlusif),
- doses (avec, le cas échéant, le véhicule) et concentrations,
- dose sans effet, lorsque c'est possible,
- données relatives à la réponse toxique par sexe et par dose,
- indication du moment de la mort en cours d'expérience ou des survies au terme de l'expérience,
- effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,
- données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel,
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets,
- examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B. 10. MUTAGENICITE – ESSAI *IN VITRO* D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR

CELLULES DE MAMMIFERE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 473, Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* est destiné à détecter les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de mammifère en culture (1, 2, 3). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mis parfois de type chromosomique. Une augmentation de la fréquence de polyploïdie peut indiquer qu'une substance chimique possède la faculté de provoquer des aberrations du nombre des chromosomes. Cet essai n'est cependant pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et il n'est généralement pas utilisé à cette fin. Les mutations chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et événements connexes, touchant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules somatiques, jouent un rôle dans l'induction des cancers chez l'.

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies, des souches cellulaires ou des cultures de cellules primaires. Les cellules utilisées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype, du nombre et de la diversité des chromosomes et de la fréquence des aberrations chromosomiques spontanées.

Les essais *in vitro* requièrent généralement l'utilisation d'une source exogène d'activation métabolique. Ce système d'activation métabolique est incapable de reproduire parfaitement les conditions présentes *in vivo* chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque et pouvant provenir de modifications du pH ou de l'osmolalité, ou d'une forte cytotoxicité (4, 5).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif lors de cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérogénicité. La corrélation dépend de la classe chimique mais d'autre part, de plus en plus d'arguments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes qui n'impliquent pas des lésions directes de l'ADN.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Aberration de type chromatidien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication: processus dans lequel le noyau, après une phase S de réplication, n'entre pas en mitose mais commence une autre phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, ... chromatides.

Lacune (“gap”): lésion achromatique plus petite que la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Index mitotique: nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération de cette population.

Aberration de nombre: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polypléidie: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire $3n$, $4n$ etc.).

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Des cultures de cellules sont exposées à la substance d'essai avec et sans activation métabolique. Après avoir été exposées à la substance d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la colchicine ou du Colcemid®), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique afin de détecter les aberrations chromosomiques.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Préparations

1.4.1.1 Cellules

Diverses lignées cellulaires, souches cellulaires ou cultures de cellules primaires, y compris des cellules humaines, peuvent être utilisées (par exemple les fibroblastes de hamster chinois, les lymphocytes du sang périphérique de l'homme ou d'autres mammifères).

1.4.1.2 Milieu et conditions de culture

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, concentration de CO₂, température et degré d'humidité) appropriés pour la croissance cellulaire. La stabilité du nombre modal de chromosomes et l'absence de contamination par des mycoplasmes doivent être vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires établies et les souches cellulaires. En cas de contamination, elles ne doivent pas être utilisées. La durée normale du cycle cellulaire de la lignée cellulaire et les conditions de culture utilisées doivent être connues.

1.4.1.3 *Préparation des cultures*

Lignées et souches cellulaires établies: les cellules sont multipliées à partir de stocks cellulaires, ensemencées dans un milieu de culture à une densité telle que les cultures ne confluent pas avant la récolte, et incubées à 37 °C.

Lymphocytes: du sang complet traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés issus de donneurs sains sont ajoutés à un milieu de culture contenant un mitogène (par exemple la phytohémagglutinine) et sont incubés à 37 °C.

1.4.1.4 *Activation métabolique*

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteurs (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, tels que de l'Aroclor 1254 (6, 7, 8, 9) ou un mélange de phénobarbitone et de β -naphthoflavone (10, 11, 12).

La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à des concentrations allant de 1 à 10 % v/v dans le milieu de culture final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut être préférable d'utiliser plus d'une concentration de la fraction post-mitochondriale.

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création par génie génétique de lignées cellulaires exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par l'importance de l'isoenzyme du cytochrome P450 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5 *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement au système d'essai et/ou diluées avant traitement. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2 **Conditions expérimentales**

1.4.2.1 *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans le cas de essais conduits avec des substances instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée par addition d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2 *Concentrations d'exposition*

La cytotoxicité, la solubilité dans le système d'essai et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à utiliser.

La cytotoxicité est mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur approprié de l'intégrité et de la croissance cellulaires, tel que le degré de confluence des colonies cellulaires, le nombre de cellules viables ou l'index mitotique. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité lors d'un essai préliminaire.

Il convient d'utiliser au moins trois concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, on utilisera des concentrations qui couvrent un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie en général des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et $\sqrt{10}$ au maximum. La concentration la plus élevée doit entraîner, au moment de la récolte, une réduction significative (au moins 50 %) du degré de confluence, du nombre de cellules ou de l'index mitotique. Ce dernier varie dans le temps après le traitement et fournit seulement une mesure indirecte des effets cytotoxiques et cytostatiques. Cependant, l'index mitotique est une mesure acceptable pour des cultures en suspension pour lesquelles d'autres mesures de toxicité peuvent être incommodes ou irréalisables. Des données sur la cinétique du cycle cellulaire, par exemple le temps de génération moyen (TGM), peuvent fournir des compléments d'information. Toutefois, le TGM est une moyenne générale qui ne révèle pas toujours l'existence de "sous-populations en retard" ; même de faibles augmentations du temps de génération moyen peuvent conduire à un retard très important du moment où le nombre d'aberrations est optimal.

En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes: 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01M.

Pour les substances relativement insolubles qui ne sont pas toxiques aux concentrations où celles sont solubles, la dose la plus élevée à tester doit être une concentration supérieure à la limite de solubilité dans le milieu de culture à la fin de la période de traitement. Dans certains cas (par exemple si la toxicité n'apparaît qu'à des concentrations supérieures à la plus faible concentration insoluble), il est recommandé de tester plusieurs concentrations auxquelles une précipitation est visible. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'oeil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3 *Témoins négatifs et positifs*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule), avec et sans activation métabolique, doivent être inclus simultanément dans chaque expérience. En présence d'un système d'activation métabolique, la substance utilisée comme témoin positif doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

On utilise comme témoin positif un clastogène connu à des niveaux d'exposition qui conduisent à un accroissement détectable et reproductible par rapport au bruit de fond, démontrant la sensibilité du système d'essai.

Les doses des témoins positifs doivent être choisies de manière que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas évidente. Quelques exemples de témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Substance	N° CAS	N° EINECS
En l'absence d'activation métabolique exogène	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
	Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
	N-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1
En présence d'activation métabolique exogène	Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
	Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique sera envisagé, s'ils sont disponibles.

La substance-véhicule doivent être utilisés seuls en tant que témoins négatifs dans le même milieu de culture, dans les mêmes conditions que la substance d'essai et pour chaque temps de prélèvement. On utilisera également des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant/véhicule choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

1.4.3 Mode opératoire

1.4.3.1 Traitement avec la substance d'essai

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence de système d'activation métabolique. Le traitement des lymphocytes doit débuter environ 48 heures après la stimulation mitogénique.

1.4.3.2

On réalise normalement des cultures dupliquées à chaque niveau de dose. Des cultures dupliquées sont aussi vivement recommandées pour les témoins négatifs (solvant). Si des essais antérieurs ont démontré que la variation entre cultures dupliquées est minime (13, 14), l'utilisation d'une seule culture pour chaque concentration peut être envisagée.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (15, 16).

1.4.3.3 *Récolte des cultures*

Pour la première expérience, les cellules sont exposées à la substance d'essai pendant 3 à 6 heures, en présence et en l'absence d'activation métabolique. On prélève ensuite des échantillons après un temps correspondant à environ 1,5 fois la durée du cycle cellulaire normal après le début du traitement (12). Si l'essai s'avère négatif, que ce soit avec et sans activation métabolique, on effectue un essai supplémentaire sans activation, le traitement se poursuivant jusqu'au prélèvement d'échantillons après une période équivalente à environ 1,5 fois la durée du cycle cellulaire normal. Certaines substances peuvent être détectées plus facilement en prolongeant le temps de traitement et de prélèvement au-delà de 1,5 fois la durée du cycle cellulaire. Les résultats négatifs obtenus avec activation métabolique demandent à être confirmés au cas par cas. Si la confirmation des résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie.

1.4.3.4 *Préparation des chromosomes*

Les cultures de cellules sont traitées avec du Colcemid® ou de la colchicine pendant une à trois heures avant la récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément en vue de la préparation des chromosomes. Celle-ci consiste en un traitement hypotonique, une fixation et une coloration des cellules.

1.4.3.5 *Analyse*

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte de chromosomes. Pour cette raison, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal au nombre modal ± 2 . Pour chaque dose et chaque témoin, il y a lieu d'examiner au moins 200 cellules en métaphase bien étalées et, le cas échéant, réparties de façon égale entre les cultures en double exemplaire. Ce nombre peut être réduit lorsqu'un grand nombre d'aberrations sont observées.

Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques de structure, il est important de signaler d'éventuels cas de polyploidie et d'endoreduplication.

2. **RESULTATS**

2.1 **TRAITEMENT DES RESULTATS**

L'unité expérimentale étant la cellule, on détermine le pourcentage de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure. Une liste des différents types d'aberrations chromosomiques de structure doit être établie avec leur nombre et leur fréquence. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

On indiquera aussi les résultats des mesures concomitantes de cytotoxicité pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs dans les principaux essais d'aberration.

Les données seront présentées séparément pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Il n'est pas obligatoire de vérifier une réponse nettement positive. Par contre, les résultats équivoques doivent être clarifiés par un essai supplémentaire, de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. La nécessité de confirmer les résultats négatifs est discutée au paragraphe 1.4.3.3. Lors des expériences complémentaires, il faut envisager la modification des paramètres de l'étude afin d'élargir l'éventail des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'intervalle entre les niveaux de dose et les conditions d'activation métabolique.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement lié à la dose ou un accroissement reproductible du nombre de cellules présentant des aberrations. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (3, 13) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations de nombre. Une augmentation du nombre de cellules ayant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (17, 18).

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans de rares cas l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs à l'essai d'aberration chromosomique *in vitro* indiquent que la substance d'essai induit des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules somatiques de mammifère en culture. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions expérimentales, la substance d'essai n'induit pas d'aberration chromosomique dans des cellules somatiques de mammifère en culture.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules:

- type et source des cellules,
- données sur le caryotype et raisons du choix du type cellulaire utilisé,
- absence de mycoplasme, le cas échéant,
- données concernant le cycle cellulaire,
- sexe des donneurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène utilisé,
- nombre de repiquages, le cas échéant,
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,
- nombre modal de chromosomes.

Conditions de l'essai:

- identité de l'inhibiteur de la métaphase, sa concentration et la durée d'exposition des cellules,
- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,
- composition du milieu et, le cas échéant, la concentration de CO₂,
- concentration de la substance d'essai,
- volume de véhicule et de substance d'essai ajouté,
- température d'incubation,
- temps d'incubation,
- durée du traitement,
- densité cellulaire au moment de l'ensemencement, si nécessaire,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- témoins positifs et négatifs,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de métaphases analysées,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque.

Résultats:

- signes de toxicité (degré de confluence, données sur le cycle cellulaire, comptage des cellules, index mitotique),
- signes de précipitation,
- données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées,
- définition appliquée aux aberrations, y compris les lacunes;
- nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques et type d'aberration, séparément pour chaque culture traitée et culture témoin,
- changements de la ploïdie, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,
- données historiques concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes, écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4.

BIBLIOGRAPHIE

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
2. Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.
3. Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), 1-175.
4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.

6. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
7. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
8. Natarajan, A.T., Tate, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
9. Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66, 277-290.
10. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
11. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
12. Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, 241-261.
13. Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
14. Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, 139-149.
15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
16. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
17. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.
18. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

B.11. MUTAGENICITE – ESSAI *IN VIVO* D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE

OSSEUSE DE MAMMIFERE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 475, Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai *in vivo* d'aberration chromosomique est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (1, 2, 3, 4). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. Une augmentation de la fréquence de polyploïdie peut indiquer qu'une substance chimique possède la faculté de provoquer des aberrations du nombre des chromosomes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mais parfois de type chromosomique. Les mutations chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et événements connexes, touchant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules somatiques, jouent un rôle dans l'induction de cancers chez l'homme et chez les animaux de laboratoire.

Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse parce que c'est un tissu très vascularisé, formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et traiter. D'autres espèces et tissus cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Cet essai d'aberration chromosomique se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs de métabolisme *in vivo*, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN. Ces facteurs peuvent cependant varier d'un animal à un autre et d'un tissu à un autre. Un essai *in vivo* est aussi utile pour vérifier un effet mutagène détecté par un essai *in vitro*.

On n'aura pas recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Aberration de type chromatidien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication: processus dans lequel le noyau, après une phase S de réplication, n'entre pas en mitose mais commence une autre phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, ... chromatides.

Lacune: lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polypléidie: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire $3n$, $4n$ etc.).

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la colchicine ou du Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules de moelle osseuse sont colorées, et les cellules en métaphase sont examinées en vue de la mise en évidence d'aberrations chromosomiques.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Préparations

1.4.1.1 *Sélection des espèces animales*

Bien que le rat, la souris et le hamster chinois soient habituellement utilisés, n'importe quelle espèce de mammifère appropriée peut être utilisée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale entre les animaux doit être minimale et ne pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2 *Conditions de stabulation et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60%.

1.4.1.3 *Préparation des animaux*

Les animaux sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

1.4.1.4 *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis si nécessaire diluées avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2 **Conditions expérimentales**

1.4.2.1 *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2 *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus pour chaque sexe et dans chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure *in vivo* à des niveaux d'exposition supposés provoquer un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient évidents mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	N° CAS	N° EINECS
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Triéthylèneméline	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. Dans le cas où un seul prélèvement est effectué pour les témoins négatifs, le premier temps de prélèvement est le plus approprié. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

1.5 MODE OPERATOIRE

1.5.1 Nombre et sexe des animaux

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables par sexe. Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques sur la même espèce et avec la même voie d'administration démontrant l'absence de différence notable de toxicité entre les sexes, la réalisation de l'essai sur un seul sexe est acceptable. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2 Modes d'administration

Il est préférable d'administrer la substance d'essai en une seule fois. Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modes d'administration doivent être scientifiquement justifiés.

Les échantillons sont prélevés après le traitement à deux moments différents de la même journée. Pour les rongeurs, le premier prélèvement après le traitement est effectué après une période de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures). Étant donné que le temps requis par l'absorption et le métabolisme de la substance d'essai ainsi que l'effet de celle-ci sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal de détection des aberrations, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Si le traitement s'étend sur plus d'une journée, le prélèvement doit avoir lieu après une période de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après la dernière administration.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les prélèvements sont effectués après une période appropriée, qui est de 3 à 5 heures pour la souris et de 4 à 5 heures pour le hamster chinois. Les cellules sont prélevées de la moelle osseuse et analysées en vue de la détection d'aberrations chromosomiques.

1.5.3 **Niveaux de dose**

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et le même schéma de traitement que ceux de l'étude principale (5). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de doses doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50 % de l'index mitotique).

1.5.4 **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Pour les études de plus longue durée, la dose limite est de 2000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement d'une durée allant jusqu'à 14 jours et de 1000 mg/kg de poids corporel/jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5 **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6 **Préparation des chromosomes**

La moelle osseuse est extraite immédiatement après le sacrifice, exposée à une solution hypotonique et fixée. Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées.

1.5.7 Analyse

L'index mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et doit être déterminé sur un minimum de 1000 cellules pour chaque animal traité (y compris les témoins positifs) et pour chaque témoin négatif non traité.

L'analyse des aberrations chromosomiques doit porter sur au moins 100 cellules de chaque animal. Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Comme le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Pour chaque animal, on indiquera le nombre de cellules examinées et on évaluera le nombre d'aberrations par cellule ainsi que le pourcentage de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et les groupes témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul moment de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de déterminer la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (6) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'induire des aberrations de nombre. Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (7, 8).

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans des rares cas l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai *in vivo* d'aberration chromosomique indiquent qu'une substance induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites atteignent la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3.

RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions de stabulation, régime alimentaire, etc.,
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix de la voie d'administration,
- méthodes pour vérifier que la substance a atteint la grande circulation ou le tissu cible, le cas échéant,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,
- description détaillée des schémas de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- nature et concentration de l'inhibiteur de la métaphase et durée du traitement,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

- signes de toxicité,
- index mitotique,
- type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,
- nombre total d'aberrations par groupe, moyennes et écarts-types,
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyennes et écarts-types,
- changements de la ploïdie, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs concomitants,
- données concernant les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- données concernant les témoins positifs concomitants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, 157-165.
3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
4. Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 305-312.
5. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
7. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, 403-413.
8. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

B. 12. MUTAGENICITE – ESSAI *IN VIVO* DU MICRONOYAU SUR ERYTHROCYTES

DE MAMMIFERE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 474, Test du micronoyau sur les érythrocytes de mammifère (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai du micronoyau *in vivo* sur des cellules de mammifère est pratiqué en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il repose sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans le sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.

L'essai du micronoyau est destiné à identifier les substances qui provoquent des lésions cytogénétiques se traduisant par la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers.

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte polychromatique, le noyau principal est expulsé et chaque micronoyau qui s'est formé peut subsister dans le cytoplasme anucléé. La visualisation des micronoyaux est facilitée par l'absence du noyau principal. Un accroissement de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques des animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique induite.

La moelle osseuse des rongeurs est couramment utilisée dans cet essai, les érythrocytes polychromatiques étant produits dans ce tissu. Le comptage des érythrocytes (polychromatiques) immatures micronucléés dans le sang périphérique est également acceptable chez toute espèce où l'on a démontré l'incapacité de la rate à éliminer les érythrocytes micronucléés ou qui présente une sensibilité suffisante pour permettre la détection des agents provoquant des aberrations chromosomiques de structure ou de nombre. Plusieurs critères permettent de distinguer les micronoyaux. Un de ces critères est la détection de la présence ou de l'absence dans les micronoyaux d'un centromère ou d'ADN centromérique. La fréquence des érythrocytes immatures (polychromatiques) micronucléés est le principal critère. Quand les animaux sont traités en continu pendant quatre semaines ou plus, on peut également rechercher dans le sang périphérique la proportion des érythrocytes matures (normochromatiques) contenant des micronoyaux par rapport à un nombre donné d'érythrocytes matures.

Cet essai *in vivo* du micronoyau pratiqué sur des érythrocytes de mammifère se prête particulièrement bien à l'évaluation des risques mutagènes, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs du métabolisme *in vivo*, de pharmacocinétique et des processus de réparation de l'ADN, malgré la variabilité de ces facteurs en fonction de l'espèce, du tissu et de l'effet génétique recherché. Un essai *in vivo* sert aussi à vérifier un effet mutagène détecté dans un système *in vitro*.

On n'aura pas recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Centromère: portion d'un chromosome qui au cours de la division cellulaire est lié aux fibres du fuseau mitotique permettant un mouvement ordonné des chromosomes-filles vers les pôles des cellules filles.

Micronoyau: petit noyau, présent en plus du noyau principal des cellules et séparé de celui-ci, produit pendant la télophase de la mitose (méiose) par des chromosomes ou des fragments de chromosomes retardataires.

Érythrocyte normochromatique: érythrocyte mature dépourvu de ribosomes et pouvant être distingué des érythrocytes immatures polychromatiques à l'aide de substances colorant sélectivement les ribosomes.

Érythrocyte polychromatique: érythrocyte immature se trouvant à un stade de développement intermédiaire, qui renferme encore des ribosomes et peut ainsi être distingué des érythrocytes matures normochromatiques à l'aide de substances colorant sélectivement les ribosomes.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée. Si on utilise la moelle osseuse, les animaux sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement, la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé à des moments appropriés après le traitement, les cellules sanguines sont étalées sur des lames et colorées (4, 8, 9, 10) En cas d'essai sur cellules du sang périphérique, il faut recueillir les cellules aussi rapidement que possible après la dernière exposition. Les lames préparées sont soumises à une analyse en vue de la détection de micronoyaux.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Préparations

1.4.1.1 *Sélection des espèces animales*

L'utilisation de souris ou de rats est recommandée en cas d'essai sur moelle osseuse, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Si l'essai porte sur le sang périphérique, on recommande d'utiliser des souris. Il est toutefois possible d'utiliser n'importe quelle espèce de mammifère appropriée, à condition que sa rate n'élimine pas les érythrocytes micronucléés ou que sa sensibilité soit suffisante pour permettre la détection d'agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure ou de nombre. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale des animaux ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2 *Conditions de stabulation et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60%.

1.4.1.3 *Préparation des animaux*

Les animaux sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement.

1.4.1.4 *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2 **Conditions expérimentales**

1.4.2.1 *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2 *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus pour chaque sexe et chaque essai. Les animaux des groupes témoins sont manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des micronoyaux *in vivo* à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les doses de témoin positif doivent être choisies de façon que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. En outre, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	CAS No.	EINECS No.
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
N-éthyl-N-nitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Triéthylènemélamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des micronoyaux provenant de témoins historiques. Dans le cas où un seul prélèvement est effectué pour les témoins négatifs, le premier temps de prélèvement est le plus approprié. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données antérieures ou publiées ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

Si le sang périphérique est utilisé, un échantillon prélevé avant le traitement peut aussi tenir lieu de témoin négatif, mais uniquement dans les études de courte durée sur sang périphérique (par exemple 1 à 3 traitements) lorsque les résultats se situent dans l'intervalle auquel on peut s'attendre sur la base de données historiques.

1.5 MODE OPERATOIRE

1.5.1 Nombre et sexe des animaux

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables par sexe (11). Si, au moment de l'étude, on dispose de données d'études antérieures effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre les sexes, il suffit d'effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2 Mode d'administration

Aucun schéma de traitement particulier (un, deux ou davantage de traitements à intervalles de 24 h) ne peut être recommandé. Les prélèvements qui proviennent d'une étude avec des procédures d'administration prolongées sont acceptables si l'essai est positif ou, pour les essais négatifs, si un effet toxique est observé ou que la dose limite a été employée et que la substance a été administrée jusqu'au moment du prélèvement. La substance d'essai peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée.

L'essai peut être effectué de deux façons:

- (a) La substance d'essai est administrée en une seule fois aux animaux. Des échantillons de moelle osseuse sont prélevés au moins deux fois, jamais avant 24 heures et pas au-delà de 48 heures après le traitement et à un intervalle approprié. Des prélèvements effectués moins de 24 heures après le traitement doivent avoir une justification. Les échantillons de sang périphérique sont prélevés au moins deux fois, jamais avant 36 heures et pas au-delà de 72 heures après le traitement et à un intervalle approprié. Si une réponse positive est observée lors d'un prélèvement, il n'est pas nécessaire de procéder à un autre prélèvement.
- (b) Dans le cas où deux doses ou plus sont administrées (par exemple deux doses ou plus à intervalle de 24 heures), les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés une seule fois entre 18 et 24 heures après le dernier traitement, et ceux de sang périphérique une seule fois entre 36 et 48 heures après le dernier traitement (12).

Des plus, d'autres temps de prélèvements peuvent être employés si nécessaire.

1.5.3 **Niveaux de dose**

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et le même schéma de traitement que ceux de l'étude principale (13). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de doses doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique).

1.5.4 **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Pour les études de plus longue durée, la dose limite est de 2000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement d'une durée allant jusqu'à 14 jours et de 1000 mg/kg de poids corporel/jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5 **Voie d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6 **Préparation de la moelle osseuse et du sang**

Les cellules de moelle osseuse sont généralement prélevées dans le fémur ou le tibia immédiatement après le sacrifice. Les cellules sont extraites, préparées et colorées suivant des méthodes bien établies. Le sang périphérique est prélevé dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié. On effectue immédiatement une coloration supravitale des cellules sanguines (8, 9, 10) ou des frottis qui sont ensuite colorés. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN [par exemple, l'orangé d'acridine (14) ou Hoechst 33258 plus pyronine-Y (15)] peut éliminer une partie des artefacts dus à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'emploi de colorants classiques (Giemsa, par exemple). D'autres méthodes, telles que celle qui est basée sur l'emploi de colonnes de cellulose pour enlever les cellules nucléées (16), peuvent être utilisées à condition que leur efficacité pour la préparation de micronoyaux dans le laboratoire ait été prouvée.

1.5.7 Analyse

Le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) est déterminé pour chaque animal en comptant au moins 200 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 1000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (17). Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés est déterminée sur la base de l'examen d'au moins 2000 érythrocytes immatures par animal. On peut obtenir des informations supplémentaires en recherchant la présence de micronoyaux dans les érythrocytes matures. À l'examen des lames, le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes ne doit pas être inférieur à 20 % de la valeur des témoins. Lorsque les animaux sont traités en continu pendant 4 semaines ou davantage, on peut aussi examiner au moins 2000 érythrocytes matures par animal pour déterminer l'incidence des érythrocytes matures micronucléés. Des systèmes d'analyse automatisée (analyse d'images et cytométrie de flux pour cellules en suspension) peuvent remplacer des techniques manuelles s'ils sont justifiés et validés.

2. RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micronucléés et le nombre d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Lorsque les animaux sont traités en continu pendant quatre semaines ou davantage, il convient de fournir également les données relatives aux érythrocytes matures, si elles ont été recueillies. Le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes et, si cela est jugé pertinent, le pourcentage d'érythrocytes micronucléés seront indiqués pour chaque animal. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment une augmentation, liée à la dose, du nombre de cellules micronucléées ou une augmentation nette du nombre de cellules micronucléées dans un seul groupe traité à un seul moment de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de déterminer la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (18, 19) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai in vivo du micronoyau indiquent que la substance induit la formation de micronoyaux qui résultent de lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique dans les érythroblastes de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas la formation de micronoyaux dans les érythrocytes immatures de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites atteignent la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3.

RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions de stabulation, régime alimentaire, etc.,
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix de la voie d'administration,
- méthodes pour vérifier que la substance a atteint la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,
- description détaillée des schémas de traitement et de prélèvement,
- méthodes de préparation des lames,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- critères de dénombrement des érythrocytes immatures micronucléés,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

- signes de toxicité,
- proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes,
- nombre d'érythrocytes immatures micronucléés, donné séparément pour chaque animal,
- moyenne \pm écart-type des érythrocytes micronucléés immatures par groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses et méthodes statistiques appliquées,
- données concernant les témoins négatifs concomitants et antérieurs,
- données concernant les témoins positifs concomitants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, 187-190.
2. Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, 9-15.
3. Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123: 61-118.
4. Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, 29-80.
5. MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: "Developments in Science and Practice of Toxicology", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555-558.
6. MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189: 103-112.
7. MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 513-522.
8. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutation Res.*, 245, 245-249.
9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, 83-98.

10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 153-159.
11. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, 293-304.
12. Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 313-319.
13. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
14. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.
15. MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269-275.
16. Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, 91-104.
17. Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, 97-99.
18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 13/14. MUTAGENICITE: ESSAI DE MUTATION REVERSE SUR BACTERIES

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 471 Essai de mutation réverse sur des bactéries (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai bactérien de mutation réverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coli* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Il sert à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases de l'ADN (1, 2, 3). Le principe de cet essai repose sur la détection de mutations qui inversent des mutations présentes dans la souche d'essai et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries de synthétiser un acide aminé essentiel. Les bactéries révertantes sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale.

Les mutations ponctuelles sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et de nombreuses données tendent à démontrer que des mutations ponctuelles frappant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le développement de tumeurs tant chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. L'essai bactérien de mutation réverse est rapide, peu coûteux et relativement facile à effectuer. Beaucoup de souches utilisées possèdent entre autres particularités, celles de les rendre plus sensibles aux mutations: séquences d'ADN plus sensibles aux mutations au niveau des sites de réversion, augmentation de perméabilité cellulaire pour les grosses molécules, élimination des systèmes de réparation de l'ADN ou favorisation (augmentation) des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN. La spécificité des souches d'essai peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents génotoxiques. On dispose pour les essais bactériens de mutation réverse de très nombreux résultats pour une grande variété de structures et d'une méthodologie d'essai qui est bien au point et qui peut être appliquée à des substances ayant des propriétés physico-chimiques très diverses, y compris les composés volatils.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Un **essai de mutation réverse** chez *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* détecte, chez une souche dont la croissance requiert la présence d'un acide aminé (respectivement histidine ou tryptophane), des mutations qui transforment cette souche en une souche dont la croissance s'effectue indépendamment d'un apport extérieur de cet acide aminé.

Les **mutagènes provoquant la substitution de paires de bases** sont des agents qui entraînent le remplacement d'une base de l'ADN. Lors d'un essai de réversion, cette modification peut avoir lieu sur le site de la mutation initiale ou sur un autre site du génome bactérien.

Les **mutagènes décalant le cadre de lecture** sont des agents qui provoquent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans l'ADN, modifiant ainsi le cadre de lecture dans l'ARN.

1.3 CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

L'essai bactérien de mutation réverse porte sur des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifère notamment du point de vue d'absorption, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de réparation de l'ADN. Les essais *in vitro* nécessitent généralement une activation métabolique exogène. Comme les systèmes d'activation métabolique *in vitro* ne peuvent pas reproduire parfaitement le métabolisme des cellules de mammifère *in vivo*, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance chez les mammifères.

L'essai de mutation réverse sur bactéries est couramment employé comme première étape pour la détection de l'activité génotoxique en général et des mutations ponctuelles en particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de substances chimiques qui se révèlent positives dans cet essai présentent aussi une activité mutagène dans d'autres essais. Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai. Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou à des différences de biodisponibilité. D'autre part, les facteurs qui amplifient la sensibilité de l'essai de mutation réverse sur bactéries peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.

L'essai de mutation réverse sur bactéries peut ne pas convenir pour l'évaluation de certaines classes de substances chimiques, par exemple les composés fortement bactéricides (certains antibiotiques, par exemple) et ceux dont on soupçonne (ou on sait) qu'ils interfèrent spécifiquement avec le système de réplication des cellules de mammifère (par exemple les inhibiteurs de la topoisomérase ou certains analogues de nucléosides). Dans de tels cas, des essais de mutation sur des cellules de mammifère peuvent s'avérer plus appropriés.

Bien que de nombreux composés qui donnent un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, la corrélation n'est pas parfaite. Celle-ci dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérigènes qui ne sont pas détectées par cet essai parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules bactériennes.

1.4 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Des bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Dans le cas de la méthode d'incorporation directe (méthode par étalement), ces suspensions sont mélangées avec la gélose de surface et déposées immédiatement sur le milieu minimum. Dans le cas de la méthode avec pré-incubation, le mélange de traitement est incubé et ensuite mélangé avec une couche de gélose de surface avant d'être étalé sur le milieu minimum. Dans les deux techniques, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des révertants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant.

Plusieurs méthodes permettant de réaliser l'essai de mutation réverse sur bactéries ont été décrites. Parmi celles qui sont communément utilisées figure la méthode par incorporation directe (1, 2, 3, 4), la méthode de la pré-incubation (2, 3, 5, 6, 7, 8), la méthode de la fluctuation (9, 10) et la méthode par suspension (11). Des méthodes modifiées pour les essais avec des gaz ou des vapeurs ont été décrites (12).

Les modes opératoires décrits se réfèrent principalement aux méthodes d'incorporation directe et de pré-incubation. Chacune de ces méthodes peut être utilisée avec et sans activation métabolique. L'utilisation de la méthode avec préincubation permet de détecter plus efficacement l'effet mutagène de certaines substances. Ces substances appartiennent à des classes chimiques qui comprennent les nitrosamines aliphatiques à chaînes courtes, les métaux bivalents, les aldéhydes, les colorants azoïques et les composés diazoïques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les composés allyliques et nitrés (3). Il est également admis que certaines classes de mutagènes ne sont pas toujours détectées par les méthodes conventionnelles telles que l'incorporation directe ou la pré-incubation. Ces substances doivent être considérées comme des cas particuliers et il est fortement recommandé d'utiliser d'autres méthodes de détection. On a pu mettre en évidence les cas particuliers suivants (ainsi que des exemples de méthodes qui pourraient servir à leur détection): colorants azoïques et composés diazoïques (3, 5, 6, 13), gaz et substances chimiques volatiles (12, 14, 15, 16), glycosides (17, 18). Tout écart par rapport au mode opératoire standard demande à être scientifiquement justifié.

1.5 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.5.1 Préparations

1.5.1.1 Bactéries

On laisse des cultures fraîches de bactéries se développer jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance (environ 10^9 cellules par ml). Des cultures en fin de phase stationnaire ne doivent pas être utilisées. Il est essentiel que les cultures utilisées pour cet essai présentent une concentration élevée de bactéries viables. La concentration peut être déterminée à partir des données historiques sur les courbes de croissance des souches bactériennes utilisées ou, lors de chaque essai, par la détermination du nombre de cellules viables à l'aide de la méthode par étalement.

La température d'incubation recommandée est de 37 °C.

Au moins cinq souches de bactéries doivent être employées. Celles-ci doivent comprendre quatre souches de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537 ou TA97a ou TA97, TA98 et TA100) pour lesquelles des comparaisons entre laboratoires ont démontré la fiabilité et la reproductibilité de la réponse. Ces souches, qui comportent des paires de bases GC sur les sites primaires de réversion, risquent toutefois de ne pas déceler certains mutagènes oxydants, des agents de réticulation et des hydrazines. Ces substances mutagènes peuvent être détectées à l'aide de souches d'*E. coli* WP2 ou de *S. typhimurium* TA102 (19) qui ont une paire de bases AT sur le site primaire de réversion. Par conséquent, il est recommandé de mettre en oeuvre la combinaison de souches suivante:

- *S. typhimurium* TA1535 et
- *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a et
- *S. typhimurium* TA98 et
- *S. typhimurium* TA100 et
- *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

Pour les mutagènes à pouvoir réticulant, il peut être préférable d'inclure la souche TA102 ou d'ajouter une souche d'*E. coli* pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN [*E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101), par exemple].

La préparation des cultures souches, la vérification des marqueurs et le stockage doivent s'effectuer suivant des méthodes reconnues. Pour chaque culture souche congelée, il faut démontrer que la croissance exige la présence d'un acide aminé (histidine pour *S. typhimurium* et tryptophane pour *E. coli*). D'autres caractéristiques phénotypiques demandent également à être vérifiées, à savoir la présence ou l'absence de plasmides de résistance, s'il y a lieu [résistance à l'ampicilline des souches TA98, TA100 et TA97a ou TA97, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101), et résistance à l'association ampicilline/tétracycline de la souche TA102], ainsi que la présence de mutations caractéristiques (à savoir la mutation rfa chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité au cristal violet et la mutation uvrA chez *E. coli* ou uvrB chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité aux UV) (2, 3). D'autre part, les souches doivent produire un nombre de colonies de révertants spontanés par boîte qui se situe dans la gamme de fréquence prévue sur la base des données historiques du laboratoire et de préférence être comparable aux valeurs citées dans la littérature.

1.5.1.2 Milieu

On utilise une gélose minimale appropriée (composée, par exemple, de milieu minimal E de Vogel-Bonner et de glucose) et une gélose de recouvrement contenant de l'histidine et de la biotine ou du tryptophane pour permettre quelques divisions cellulaires (1, 2, 9).

1.5.1.3 Activation métabolique

Les bactéries sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus communément utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques comme Aroclor 1254 (1, 2) ou une combinaison de phénobarbital et de β -naphthoflavone (18, 20, 21). La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 5 et 30 % v/v dans le mélange S9. Le choix et la composition du système d'activation métabolique peuvent varier suivant la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser plusieurs concentrations de la fraction post-mitochondriale. Dans le cas de composés azoïques et diazoïques, un système d'activation métabolique réducteur peut s'avérer plus approprié (6, 13).

1.5.1.4 Substance d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des bactéries. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées au système d'essai directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des bactéries et l'activité du mélange S9 (22). L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau.

1.5.2 Conditions expérimentales

1.5.2.1 Souches utilisées (voir 1.5.1.1)

1.5.2.2 Concentration d'exposition

La cytotoxicité et la solubilité dans le mélange d'essai final sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en oeuvre.

Un essai préliminaire destiné à déterminer la toxicité et les caractéristiques de solubilité peut être utile. La cytotoxicité peut être détectée par une réduction du nombre de révertants, un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien ou une diminution du taux de survie des cultures traitées. Les systèmes d'activation métabolique peuvent avoir une influence sur la cytotoxicité d'une substance. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation dans le mélange final est observée à l'oeil nu dans les conditions réelles de l'essai.

Pour les substances d'essai solubles et non cytotoxiques, on recommande une concentration maximale de 5 mg ou 5 µl par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5 µl par boîte, l'essai doit comprendre une ou plusieurs concentrations auxquelles on observe une insolubilité. Pour les substances qui sont déjà cytotoxiques à une concentration inférieure à 5 mg ou 5 µl/boîte, l'essai doit être effectué jusqu'à une concentration cytotoxique. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

Pour un premier essai, il convient de tester au moins cinq concentrations analysables différentes de la substance d'essai, avec des intervalles d'environ une demi-unité logarithmique, c'est-à-dire $\sqrt{10}$. Pour établir une relation dose-réponse, il peut s'avérer nécessaire de réduire ces intervalles. Dans le cas de substances d'essai contenant des quantités substantielles d'impuretés potentiellement mutagènes, il peut être utile d'effectuer des essais avec des concentrations supérieures à 5 mg ou 5 µl/boîte.

1.5.2.3 Témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule), spécifiques de la souche, doivent être inclus dans chaque essai, avec ou sans activation métabolique. Dans le cas des témoins positifs, on utilisera une concentration permettant de démontrer l'efficacité de chaque essai.

Pour les essais avec système d'activation métabolique, le ou les témoins positifs de référence doivent être choisis en fonction du type de souche bactérienne utilisé.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs pour les essais avec activation métabolique:

N° CAs	N° EINECS	Nom
781-43-1	212-308-4	diméthyl-9,10 anthracène
57-97-6	200-359-5	diméthyl-7,12 benz[a]anthracène
50-32-8	200-028-5	benzo[a]pyrène
613-13-8	210-330-9	amino-2 anthracène
50-18-0	200-015-4	cyclophosphamide
6055-19-2		Monohydrate de cyclophosphamide

La substance suivante convient comme témoin positif pour la méthode d'activation métabolique réductrice:

573-58-0	209-358-4	rouge Congo
----------	-----------	-------------

L' amino-2 anthracène ne peut être utilisé comme indicateur unique de l'efficacité du mélange S9. S'il est utilisé, il faut également caractériser chaque lot de S9 avec un mutagène qui requiert une activation métabolique par des enzymes microsomaux, benzo[a]pyrène et diméthylbenzanthracène par exemple.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs spécifiques de souches pour les essais sans activation métabolique exogène:

N° CAS	N° EINECS	Nom	Souche
26628-22-8	247-852-1	azoture de sodium	TA 1535 et TA 100
607-57-8	210-138-5	nitro-2 fluorène	TA 98
90-45-9	201-995-6	amino-9 acridine	TA 1537, TA 97 et TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 et TA 97a
80-15-9	201-254-7	hydropéroxyde de cumène	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycine C	WP2 uvrA et TA102
70-25-7	200-730-1	N-éthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	WP2, WP2uvrA et WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	1-oxyde de 4-nitroquinoléine	WP2, WP2uvrA et WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furylfuramide (AF2)	souches contenant des plasmides

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés comme référence. L'utilisation de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagée, s'ils sont disponibles.

L'essai doit comprendre des témoins négatifs constitués de solvant ou véhicule sans substance d'essai, auxquels sont appliquées les mêmes conditions expérimentales qu'à la substance d'essai. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

1.5.3 **Mode opératoire**

Pour la méthode par étalement (1, 2, 3, 4) sans activation métabolique, on ajoute généralement 0,05 ml ou 0,1 ml de la solution à tester, 0,1 ml de culture bactérienne fraîche (contenant environ 10^8 cellules viables) et 0,5 ml de tampon stérile à 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pour l'essai avec activation métabolique, on mélange habituellement 0,5 ml du mélange d'activation métabolique contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriale (entre 5 et 30 % v/v), les bactéries et la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On laisse la gélose de recouvrement se solidifier avant incubation.

Dans la méthode de la pré-incubation (2, 3, 5, 6), la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, est pré-incubée avec la souche d'essai (environ 10^8 cellules viables) et un tampon stérile ou 0,5 ml du système d'activation métabolique généralement pendant 20 minutes ou plus à 30-37 °C. On ajoute ensuite la gélose de recouvrement et on verse le tout sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On mélange généralement 0,05 ou 0,1 ml de la substance d'essai, ou d'une solution de celle-ci, 0,1 ml de bactéries et 0,5 ml de mélange S9 ou de tampon stérile avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pendant la pré-incubation, les tubes doivent être aérées par agitation.

Pour une bonne estimation de la variation, chaque concentration doit être testée dans trois boîtes de Petri. Le nombre de boîtes peut être limité à deux si cela se justifie scientifiquement. La perte accidentelle d'une boîte n'invalide pas nécessairement l'essai.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients hermétiquement fermés (12, 14, 15, 16).

1.5.4 **Incubation**

Toutes les boîtes d'un essai donné doivent être incubées à 37 °C pendant 48-72 heures. À la fin de la période d'incubation, on compte dans chaque boîte le nombre de colonies révertantes.

2. RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les données doivent être présentées sous la forme du nombre de colonies révertantes par boîte. Le nombre de colonies révertantes dans les boîtes de témoins négatifs (témoins traités avec le solvant et, le cas échéant, témoins non traités) et positifs doit également être mentionné. Le dénombrement par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et l'écart-type doivent être indiqués pour la substance d'essai ainsi que pour les témoins positifs et négatifs (non traités et/ou traités au solvant).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse manifestement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés au cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation, il convient d'envisager une modification des conditions expérimentales, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses, la méthode de traitement (étalement ou pré-incubation en milieu liquide) et les conditions d'activation métabolique.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre de révertants ou une augmentation reproductible du nombre de colonies de révertants par boîte à une ou plusieurs concentrations pour au moins une souche, avec ou sans activation métabolique (23). En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (24) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus à l'essai de mutation réverse sur bactéries indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitution de bases ou décalage du cadre de lecture dans le génome de *Salmonella typhimurium* et/ou *Escherichia coli*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du solvant/véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Souches:

- souches utilisées,
- nombre de cellules par culture,
- caractéristiques des souches.

Conditions expérimentales:

- quantité de substance d'essai par boîte (mg/boîte ou µl/boîte) et justification du choix des doses et du nombre de boîtes par concentration,
- milieux utilisés,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- procédés de traitement.

Résultats:

- signes de toxicité,
- signes de précipitation,
- dénombrement par boîte,
- nombre moyen de colonies révertantes par boîte et écart-type,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants (étendues, moyennes et écarts-types),
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
2. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
4. Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, 69-240.
5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, 91-96.
6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167-177.
9. Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 33-42.
10. Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
11. Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, 453-465.
12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, 335-344.
13. Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, 33-47.
14. Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, 2-141.
15. Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
16. Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, 421-441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, 3780-3782.
18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4961-4965.
19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. *Mutagenesis*, 5, 285-291.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "*In Vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88 343-350.
23. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, 83-91.
24. Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B. 15

MUTATION GÉNIQUE — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Diverses souches haploïdes et diploïdes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être utilisées pour mesurer la production de mutations géniques induites par des agents chimiques en présence et en l'absence d'activation métabolique.

La mesure de mutation en avant dans les souches haploïdes peut être réalisée notamment par la mesure du passage des mutants rouges exigeant l'adénine (*ade-1*, *ade-2*) à une forme blanche doublement exigeante pour l'adénine ainsi que des systèmes sélectifs tels que l'induction de la résistance à la canavanine et la cycloheximide.

La méthode de mutation reverse la plus largement utilisée implique l'utilisation de la souche haploïde XV 185-14C qui porte les mutations non-sens ochre *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* et *trp 5-48*, lesquelles sont réversibles par des mutagènes provoquant des substitutions de bases qui induisent des mutations à un site spécifique ou des mutations suppressives ochre. La souche XV 185-14C porte également le marqueur *his 1-7*, une mutation contre-sens principalement révertée par des mutations de second site et le marqueur *hom 3-10* qui est réverté par des mutagènes conduisant au décalage du cadre de lecture du code génétique (*frameshift mutagens*).

La seule souche diploïde de *S. cerevisiae* largement validée est la souche D₇, homozygote pour *ilv 1-92*.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les solutions des substances d'essai ainsi que celles des substances témoins seront préparées, immédiatement avant l'essai, à l'aide d'un véhicule approprié. Lorsqu'il s'agit de substances organiques non solubles dans l'eau, les solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétone ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) devraient être utilisés à une concentration ne dépassant pas 2% v/v. La concentration finale du véhicule ne doit pas affecter de manière significative la viabilité des cellules ni les caractéristiques de croissance.

Activation métabolique

Les cellules devraient être exposées aux substances d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène approprié.

La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à ajouter la fraction post-mitochondriale préparée à partir de foies de rongeurs prétraités par des inducteurs enzymatiques additionnée de co-facteurs. L'usage d'autres espèces, tissus, fractions post-mitochondriales, ou méthodes peut aussi convenir pour l'activation métabolique.

Conditions d'essai

Souches d'expérience

La souche haploïde XV 185-14C et la souche diploïde D₇ sont les plus fréquemment utilisées dans les études de mutation génique. D'autres souches peuvent également convenir.

Milieux

Des milieux de culture appropriés sont utilisés pour déterminer la survie cellulaire et le nombre de mutants.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs, des témoins non traités et des témoins en présence de solvant devraient être simultanément réalisés. Des substances chimiques témoins positives appropriées devraient être utilisées pour concrétiser chaque effet mutagène spécifique.

Concentration d'exposition

Au moins 55 concentrations convenablement espacées devraient être utilisées. Dans le cas de substances toxiques, la concentration maximale testée ne fera pas descendre le taux de survie en dessous de 5 à 10%. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. En ce qui concerne les substances non toxiques très solubles dans l'eau, la concentration la plus élevée sera déterminée cas par cas.

Conditions d'incubation

Les boîtes sont incubées dans l'obscurité à une température de 28 à 30 °C pendant 4 à 7 jours.

Fréquences de mutation spontanée

On utilisera des subcultures dont les fréquences de mutations spontanées se situent dans les limites normales admises.

Nombre de répétitions

Trois boîtes au moins seront utilisées par concentration, en vue de déterminer les prototrophes produits par mutation génique et d'observer la viabilité des cellules. Dans le cas d'expériences utilisant des marqueurs tels que *hom* 3-10 à faible taux de mutation, le nombre des boîtes utilisées peut être augmenté afin de fournir des données statistiquement pertinentes.

Conduite de l'essai

Les souches de *S. cerevisiae* sont habituellement traitées au cours d'un essai en milieu liquide impliquant l'utilisation de cellules en phase stationnaire ou de croissance. Les expériences initiales devraient être faites sur des cellules en croissance. $1 - 5 \times 10^7$ cellules/ml sont exposées à la substance d'essai pendant une période allant jusqu'à 18 heures, à une température de 28 à 37 °C, le mélange étant agité; une quantité adéquate d'un système d'activation métabolique est ajoutée pendant le traitement. Si la première expérience fournit des résultats négatifs, une deuxième expérience devrait être réalisée en utilisant des cellules en phase stationnaire. Si la première expérience fournit des résultats positifs, ceux-ci sont confirmés par une expérience indépendante. À l'issue du traitement, les cellules sont centrifugées, lavées et ensemencées sur un milieu de culture approprié. Après incubation, les boîtes sont examinées afin de déterminer le taux de survie et l'induction de mutations géniques.

2.

RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous forme de tableaux indiquant le nombre de colonies comptées, le nombre de mutants, le taux de survie et la fréquence de mutants. Tous les résultats devraient être confirmés au cours d'une expérience indépendante. Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques adéquates.

3. **RAPPORT**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- souche utilisée,
- conditions d'essai: cellules en phases stationnaire ou de croissance; composition des milieux; température d'incubation et durée de celle-ci; système d'activation métabolique,
- conditions de traitement: concentration d'exposition; méthode et durée de traitement; température de traitement; témoins positifs et négatifs,
- nombre de colonies comptées; nombre de mutants; taux de survie et fréquence de mutants; relation dose-réponse, si possible; évaluation statistique des résultats,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 16
RECOMBINAISON MITOTIQUE — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, on peut déceler la recombinaison mitotique intergénique (ou plus généralement, entre un gène et son centromère) et intragénique. Dans le premier cas, on parle de *crossing-over* mitotique lequel donne naissance à des échanges réciproques, tandis que, dans le second cas, les échanges sont le plus souvent non réciproques et l'on parle de conversion génique. Le *crossing-over* est généralement déterminé par la production de colonies ou de secteurs récessifs homozygotes à partir d'une souche hétérozygote, tandis que la conversion génique est déterminée par la production de revertants prototrophes dans une souche auxotrophe hétéroallélique portant deux allèles défectueux différents du même gène. Les souches les plus couramment utilisées pour déceler une conversion génique mitotique sont D₄ (hétéroallélique pour *ade 2* et *trp 5*), D₇ (hétéroallélique pour *trp 5*), BZ₃₄ (hétéroallélique pour *arg 4*) et JD1 (hétéroallélique pour *bis 4* et *trp 5*). Le *crossing-over* mitotique produisant des secteurs homozygotes de couleur rouge et rose peut être déterminé dans D₅ ou dans D₇ (qui mesure aussi la conversion génique mitotique et la mutation reverse pour *ilv 1-92*), ces deux souches étant hétéroalléliques complémentaires pour les allèles *ade 2*.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les solutions des substances d'essai ainsi que celles des substances témoins ou de référence devraient être préparées, immédiatement avant l'essai, à l'aide d'un véhicule approprié. Dans le cas de substances organiques insolubles dans l'eau, on utilisera des solvants organiques, tels que l'éthanol, l'acétone et le diméthylsulfoxyde (DMSO), à une concentration ne dépassant pas 2% v/v. La concentration finale du véhicule ne devrait pas affecter de manière significative la viabilité des cellules ni les caractéristiques de croissance.

Activation métabolique

Les cellules seront exposées aux substances d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à ajouter la fraction post-mitochondriale préparée à partir de foies de rongeurs prétraités par des inducteurs enzymatiques additionnée de co-facteurs. L'usage d'autres espèces, tissus, fractions post-mitochondriales, ou méthodes peut aussi convenir pour l'activation métabolique.

Conditions d'essai

Souches d'expérience

Les souches les plus fréquemment utilisées sont les diploïdes D₄, D₅, D₇ et JD1. D'autres souches peuvent convenir.

Milieux

Des milieux de culture adéquats sont utilisés en vue de déterminer le taux de survie et la fréquence de recombinaisons mitotiques.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs, des témoins non traités et des témoins en présence de solvant seront simultanément réalisés. Des substances chimiques témoins positives appropriées seront utilisées pour chaque type spécifique de recombinaison.

Concentration d'exposition

Au moins cinq concentrations convenablement espacées de substance d'essai seront utilisées. La cytotoxicité et la solubilité sont au nombre des facteurs à prendre en considération. La concentration la plus faible ne doit avoir aucun effet sur la viabilité des cellules. Dans le cas de produits chimiques toxiques, la concentration maximale testée ne diminuera pas le taux de survie en dessous de 5 à 10%. Les produits chimiques relativement insolubles dans l'eau seront testés jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de produits chimiques non toxiques franchement solubles dans l'eau, la concentration d'essai maximale sera déterminée cas par cas.

Les cellules peuvent être exposées aux substances d'essai en phase stationnaire ou en phase de croissance pendant des périodes allant jusqu'à 18 heures. Toutefois, dans le cas d'un traitement de longue durée, les cultures seront examinées au microscope afin de déceler la formation de spores; la présence de celles-ci rendant l'essai nul.

Conditions d'incubation

Les boîtes sont incubées, dans l'obscurité, à une température de 28 à 30 °C, pendant 4 à 7 jours. Les boîtes utilisées pour la détermination des secteurs homozygotes rouge et rose produits par *crossing-over* mitotique seront conservées dans un réfrigérateur à ± 4 °C pendant 1 à 2 jours encore avant le dénombrement de manière à ce que la pigmentation des colonies concernées puisse s'intensifier.

Fréquences de recombinaisons mitotiques spontanées

On utilisera des subcultures dont les fréquences de recombinaisons mitotiques spontanées se situeront dans la gamme normalement admise.

Nombre de répétitions

Trois boîtes au moins seront ensemencées par concentration afin de déterminer la viabilité ainsi que le nombre de prototrophes produits par conversion génique mitotique. Dans le cas de la détermination d'homozygotie récessive produite par *crossing-over* mitotique, le nombre des boîtes sera augmenté pour obtenir un nombre adéquat de colonies.

Conduite de l'essai

Les souches de *S. cerevisiae* sont habituellement traitées au cours d'un essai en milieu liquide impliquant l'utilisation de cellules en phase stationnaire ou de croissance. Les expériences initiales devraient être faites sur des cellules en croissance. $1 - 5 \times 10^7$ cellules/ml sont exposées à la substance d'essai pendant une période allant jusqu'à 18 heures à des températures de 28 à 37 °C, le mélange étant agité; une quantité adéquate d'un système d'activation métabolique est ajoutée pendant le traitement. Si la première expérience fournit des résultats négatifs, une deuxième expérience devrait être réalisée en utilisant des cellules en phase stationnaire. Si la première expérience fournit des résultats positifs, ceux-ci sont confirmés par une expérience indépendante appropriée. À l'issue du traitement, les cellules sont centrifugées, lavées et ensemencées sur un milieu de culture adéquat. Après incubation, les boîtes sont examinées afin de déterminer le taux de survie et l'induction de recombinaison mitotique.

2.

RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous forme de tableaux indiquant le nombre de colonies comptées, le nombre de recombinants, le taux de survie et la fréquence de recombinants.

Tous les résultats devraient être confirmés au cours d'une expérience indépendante.

Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques adéquates.

3. **RAPPORT**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- souche utilisée,
- conditions d'essai: cellules en phase stationnaire ou en phase de croissance; composition des milieux; température d'incubation et durée d'incubation; système d'activation métabolique,
- conditions de traitement: concentration d'exposition; méthode et durée de traitement; température de traitement; témoins positifs et négatifs,
- nombre de colonies comptées; nombre de recombinants; taux de survie et fréquence de recombinaison: relation dose-réponse, si possible; évaluation statistique des résultats,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 17. MUTAGENICITE – ESSAI *IN VITRO* DE MUTATION GENIQUE SUR CELLULES

DE MAMMIFERE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 476, Essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifère permet de détecter des mutations géniques induites par des substances chimiques. Les lignées cellulaires appropriées comprennent des cellules de lymphome de souris L5178Y, les lignées CHO-AS52 et V79 de cellules de hamster chinois et les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (1). Dans ces lignées cellulaires, les critères génétiques les plus couramment utilisés sont une mutation sur les loci de la thymidine kinase (TK) et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), ainsi qu'un transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XPRT). Les essais de mutation TK, HPRT et XPRT détectent des gammes différentes d'effets génétiques. L'emplacement autosomique de TK et XPRT peut permettre de détecter des effets génétiques (par exemple des délétions importantes) qui ne sont pas détectés sur le locus HPRT de chromosomes X (2, 3, 4, 5, 6).

L'essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifère peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou de souches cellulaires. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture et de la stabilité de la fréquence de mutation spontanée.

Les essais *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique qui ne peut pas reproduire parfaitement les conditions présentes *in vivo* chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque et pouvant provenir de modifications du pH ou de l'osmolalité ou d'une forte cytotoxicité (7).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérogénicité. La corrélation dépend de la classe chimique et de plus en plus d'éléments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules de mammifères (6).

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Mutation directe: mutation génique de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique de la fonction de la protéine codée.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: substances qui entraînent le remplacement d'une ou de plusieurs bases de l'ADN.

Mutagènes décalant le cadre de lecture: substances qui entraînent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

Temps d'expression du phénotype: période pendant laquelle des produits géniques non modifiés disparaissent des cellules qui viennent de subir une mutation.

Fréquence de mutants: rapport cellules mutantes observées / cellules viables.

Croissance totale relative: augmentation du nombre de cellules dans le temps par rapport à une population témoin; elle est calculée comme le produit de la croissance en suspension par rapport au témoin négatif et de l'efficacité de clonage par rapport au témoin négatif.

Croissance relative en suspension: augmentation du nombre de cellules pendant la période d'expression par rapport au témoin négatif.

Viabilité: efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement dans des conditions sélectives après la période d'expression.

Taux de survie: efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement à la fin de la période de traitement; le taux de survie est généralement exprimé par rapport au taux de survie de la population cellulaire témoin.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les cellules déficientes en thymidine kinase (TK) par suite de la mutation directe $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules non déficientes en TK sont sensibles à la TFT, ce qui entraîne une inhibition du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, les cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que les cellules normales, qui contiennent de la TK, ne le peuvent pas. De la même façon, des cellules déficientes en HPRT ou XPRT sont sélectionnées par leur résistance à la thio-6 guanine (TG) ou à l'aza-8 guanine (AG). Lorsqu'un analogue d'une base ou une substance apparentée à l'agent sélectif est soumis à un essai de mutation génique sur des cellules de mammifère, il convient d'en étudier soigneusement les propriétés. Il faut, par exemple, examiner toute toxicité sélective soupçonnée de la substance d'essai vis-à-vis de cellules mutantes et non mutantes. Par conséquent, la performance du système ou de l'agent de sélection doit être confirmée lors de l'essai de substances ayant une similitude de structure avec l'agent de sélection (8).

Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées à la substance d'essai, avec et sans activation métabolique, pendant une période appropriée. Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (9, 10, 11, 12, 13). On détermine la cytotoxicité en mesurant l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative des cultures après la période de traitement. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque locus et du type de cellule choisi, afin de permettre une expression phénotypique presque optimale des mutations induites. On détermine la proportion de mutants en mettant en culture un nombre connu de cellules dans un milieu contenant l'agent sélectif pour détecter les cellules mutantes et dans un milieu exempt d'agent sélectif pour déterminer l'efficacité de clonage (viabilité). Les colonies sont comptées après une durée d'incubation appropriée. On compare le nombre de colonies mutantes en milieu sélectif au nombre de colonies en milieu non sélectif pour obtenir la proportion de mutants.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 **Préparations**

1.4.1.1 *Cellules*

Divers types de cellules conviennent pour ce test entre autres: sous-clones de L5178Y, CHO, AS52, V79 ou TK6. Les cellules utilisées doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée et une fréquence de mutation spontanée stable. On doit veiller à ce que les cellules ne soient pas contaminées par des mycoplasmes. Des cellules contaminées ne doivent pas être utilisées.

L'essai doit être conçu de façon à avoir une sensibilité et une puissance prédéterminées. Le nombre de cellules, de cultures et de concentrations de la substance d'essai utilisées doit refléter ces paramètres définis à l'avance (14). A chaque stade de l'essai, le nombre minimal de cellules viables survivant au traitement doit être basé sur la fréquence de mutation spontanée. Une règle générale consiste à utiliser un nombre de cellules au moins égal à dix fois l'inverse de cette fréquence. Cependant, il est recommandé d'utiliser au moins 10^6 cellules. Pour s'assurer de la performance constante de l'essai, il faut disposer de données antérieures adéquates relatives au système cellulaire utilisé.

1.4.1.2 *Milieux et conditions de culture*

On doit utiliser des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés (récipients de culture, température, concentration de CO₂ et humidité). Les milieux doivent être choisis en fonction des systèmes sélectifs et du type de cellules utilisés dans l'essai. Il est particulièrement important de choisir des conditions de culture qui assurent une croissance optimale des cellules pendant la période d'expression, ainsi que la capacité des cellules, tant mutantes que non mutantes, à former des colonies.

1.4.1.3 *Préparation des cultures*

Les cellules sont multipliées à partir de cultures souches,ensemencées dans le milieu de culture et incubées à 37 °C. Avant l'emploi des cultures pour l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent.

1.4.1.4 *Activation métabolique*

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, par exemple Aroclor 1254 (15, 16, 17, 18) ou un mélange de phénobarbitone et de β-naphthoflavone (19, 20).

La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 10 % v/v dans le milieu final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut y avoir avantage à utiliser plus d'une concentration de la fraction post-mitochondriale.

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création de lignées cellulaires génétiquement modifiées exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par la pertinence de l'isoenzyme du cytochrome P450 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5 *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un solvant ou un véhicule approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement ou après dilution au système d'essai. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2 **Conditions expérimentales**

1.4.2.1 *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée à l'aide d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2 *Concentrations d'exposition*

La cytotoxicité, la solubilité dans le mélange d'essai final et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en oeuvre.

La cytotoxicité doit être mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur pertinent de l'intégrité et de la croissance cellulaire, tel que l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité dans un essai préliminaire.

Il convient d'utiliser au moins quatre concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, ces concentrations doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie en généralement des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et $\sqrt{10}$ au maximum. Si la concentration la plus forte est basée sur la cytotoxicité, elle devrait donner un taux de survie relatif (efficacité de clonage relative) ou une croissance totale relative d'environ 10 à 20 % (mais non inférieure à 10 %). En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes: 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01M.

Les substances relativement insolubles doivent être testées jusqu'à des concentrations égales ou supérieures à la limite de solubilité dans les conditions de culture. L'insolubilité doit être mise en évidence dans le milieu de traitement final auquel les cellules sont exposées. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'oeil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3 *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus dans chaque expérience avec et sans activation métabolique. Quand l'essai est effectué avec activation métabolique, la substance utilisée comme témoin doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

Des exemples de substances pouvant servir comme témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Locus	Substance	N° CAS	N° EINECS
Absence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	TK (petites et grandes colonies)	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
Éthylnitrosourée		759-73-9	212-072-2	
Présence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-549-8
		Diméthyl-7,12 benzanthrène	57-97-6	200-359-5
	TK (petites et grandes colonies)	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
		Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodiméthylamine (pour des niveaux élevés de S9)	62-75-9	200-549-8
Benzo[a]pyrène		50-32-8	200-028-5	

D'autres substances de référence appropriées peuvent être utilisées comme témoins positifs, par exemple la 5-bromo 2'-désoxyuridine (n° CAS 59-14-3, n° EINECS 200-415-9) si le laboratoire possède des contrôles historiques relatifs à cette substance. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagé, s'ils sont disponibles.

Des témoins négatifs, constitués uniquement du solvant ou du véhicule dans le milieu de traitement et traités de la même façon que la substance d'essai, doivent être inclus. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'action délétère ou mutagène.

1.4.3 **Mode opératoire**

1.4.3.1 *Traitement avec la substance d'essai*

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (une durée de trois à six heures est généralement efficace) et peut s'étendre sur un ou plusieurs cycles cellulaires.

On peut réaliser les cultures en un seul ou en double exemplaire pour chaque concentration testée. Dans le cas des cultures en un seul exemplaire, il faut augmenter le nombre des concentrations afin d'assurer un nombre adéquat de cultures à analyser (par exemple, au moins huit concentrations analysables). Les cultures servant de témoins négatifs (solvant) sont faites en double.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (21, 22).

1.4.3.2 *Détermination du taux de survie, de la viabilité et de la proportion de mutants*

À la fin de la période d'exposition, les cellules sont lavées et mises en culture en vue de la détermination de leur taux de survie et de l'expression du phénotype mutant. La détermination de la cytotoxicité commence généralement après la période de traitement par la mesure de l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou de la croissance totale relative des cultures.

À chaque locus correspond un temps bien défini qui est nécessaire à l'expression presque optimale du phénotype des mutants nouvellement induits (HPRT et XPRT ont besoin d'au moins 6 à 8 jours et TK d'au moins 2 jours). Pour déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage, les cellules sont placées dans un milieu en présence et en l'absence d'agent(s) sélectif(s). On commence à mesurer la viabilité, qui permet de calculer la proportion de mutants, à la fin de la période d'expression en déposant les cultures dans un milieu non sélectif.

Si la substance d'essai est positive à l'essai sur L5178Y TK^{+/+}, la taille des colonies doit être déterminée dans au moins une des cultures traitées (à la concentration positive la plus élevée) et dans les témoins négatifs et positifs. Si la substance d'essai est négative à l'essai sur L5178Y TK^{+/+}, la taille des colonies doit être déterminée dans les témoins négatifs et positifs. Dans le cas des essais sur TK6TK^{+/+}, on peut également déterminer la taille des colonies.

2. RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les données doivent comprendre la détermination de la cytotoxicité et de la viabilité, le nombre de colonies et la proportion de mutants dans les cultures traitées et les cultures témoins. Dans le cas d'une réponse positive à l'essai sur L5178Y TK^{+/−}, on dénombre les colonies en distinguant les petites des grandes colonies pour au moins une concentration de la substance d'essai (concentration positive la plus élevée) et pour les témoins négatifs et positifs. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants (petites et grandes) a été étudiée en détail (23, 24). Dans l'essai TK^{+/−}, les colonies sont recensées sur la base du critère de croissance normale (grandes colonies) et de croissance faible (petites colonies) (25). Les cellules mutantes qui ont subi les altérations génétiques les plus importantes ont un temps de duplication plus long et forment donc de petites colonies. Ces altérations vont de la perte du gène entier à des aberrations chromosomiques se manifestant dans le caryotype. L'induction de petites colonies de mutants a été mise en rapport avec des substances chimiques qui engendrent des aberrations chromosomiques importantes (26). Les cellules mutantes moins affectées croissent à des vitesses semblables à celles des cellules parentales et forment de grandes colonies.

Il convient d'indiquer le taux de survie (efficacité de clonage relative) ou la croissance totale relative. La proportion de mutants doit être exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre de cellules survivantes.

Les données individuelles concernant chaque culture doivent être indiquées. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse manifestement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés au cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation effectués en cas de résultats négatifs ou équivoques, il convient d'envisager une modification des paramètres de l'étude, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses et les conditions d'activation métabolique.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant ou un accroissement reproductible de la proportion de mutants. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs d'un essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifère indiquent que la substance d'essai induit des mutations géniques dans les cellules de mammifère des cultures utilisées. Une relation dose-réponse positive, si elle est reproductible, est des plus significatives. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas de mutation génique dans les cellules de mammifère des cultures utilisées.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

- justification du choix du véhicule/solvant,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules:

- type et source des cellules,
- nombre de cultures,
- données concernant le cycle cellulaire,
- nombre de repiquages, le cas échéant,
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,
- absence de mycoplasme, le cas échéant.

Conditions de l'essai:

- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,
- composition du milieu, concentration de CO₂,
- concentration de la substance d'essai,
- volume de véhicule et de substance d'essai ajouté,
- température d'incubation,
- temps d'incubation,
- durée du traitement,
- densité cellulaire pendant le traitement,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- témoins positifs et négatifs,
- durée de la période d'expression,
- agents sélectifs,
- critères pour conclure que les résultats des essais sont positifs, négatifs ou équivoques,
- méthodes utilisées pour compter le nombre de cellules viables et de cellules mutantes,
- définition de colonies qui sont prises en compte pour le type et pour la taille, y compris les critères pour les "petites" et "grandes" colonies.

Résultats:

- signes de toxicité,
- signes de précipitation,
- données sur le pH et l'osmolalité pendant l'exposition à la substance d'essai, si elles ont été déterminées,
- taille des colonies si elle a été déterminée pour au moins les témoins négatifs et positifs,
- aptitude du laboratoire à déceler des mutants en petites colonies avec le système L5178Y TK^{+/−}, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs concomitants,
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes, écarts-types),
- proportion de mutants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
2. Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
3. Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.
4. Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394-403.
5. Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.
6. Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225-251.
9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.
10. Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.
11. Liber, H.L., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.
12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.
13. Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK^{+/+} - TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

16. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.
18. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
19. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
22. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) Mutants of L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89-102.
26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/+}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

B. 18

LÉSION ET RÉPARATION D'ADN — SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) — CELLULES DE MAMMIFÈRE — *IN VITRO*

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

L'essai de synthèse non programmée de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (UDS) mesure la synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant la région lésée par des agents chimiques et physiques. L'essai est basé sur l'incorporation de thymidine tritiée ($^3\text{H-TdR}$) dans l'ADN de cellules de mammifère ne se trouvant pas en phase S du cycle cellulaire. On peut déterminer l'incorporation de $^3\text{H-TdR}$ en examinant par autoradiographie ou par comptage en scintillation liquide (LSC) l'ADN provenant de cellules traitées. Les cellules de mammifère en culture, à moins que des hépatocytes primaires de rat ne soient utilisés, sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. L'UDS peut également être mesurée par des méthodes *in vivo*.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les substances d'essai ainsi que les substances témoins ou de référence seront, soit préparées en milieu de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés, puis diluées en milieu de culture avant d'être utilisées dans l'essai. La concentration finale du véhicule ne devrait pas affecter la viabilité cellulaire.

Des cultures primaires d'hépatocytes de rats, de lymphocytes humains ou des lignées cellulaires établies (par exemple fibroblastes humains diploïdes) peuvent être utilisées pour cet essai.

Les cellules seront exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié.

Conditions d'essai

Nombre de cultures

Au moins deux cultures cellulaires pour l'autoradiographie et six cultures cellulaires (ou moins si justifié scientifiquement) pour le comptage en scintillation liquide sont nécessaires pour chaque pont expérimental.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins simultanés positifs et négatifs (non traités et/ou véhicule), avec et sans activation métabolique, devraient être inclus dans chaque expérience. Pour l'essai sur hépatocytes de rat, on peut, par exemple, utiliser le

7,12-DMBA (7,12-diméthylbenzanthracène) ou le 2-AAF (2-acétylaminofluorène). Dans le cas de lignées cellulaires établies, on peut, pour les essais par autoradiographie et LSC réalisés sans activation métabolique, utiliser comme témoin positif par exemple le 4-NQO (4-nitroquinoline-N-oxyde); lorsqu'on a recours à des systèmes d'activation métaboliques, la N-diméthylnitrosamine est un des composés témoins positifs utilisables.

Concentration d'exposition

Une gamme de concentrations de la substance d'essai devrait être utilisée afin de permettre de déterminer au mieux la réponse. La concentration maximale devrait produire certains effets cytotoxiques.

Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité. En ce qui concerne les substances non toxiques franchement solubles dans l'eau, la concentration maximale à tester devrait être déterminée cas par cas.

Cellules

Pour l'entretien des cultures on aura recours à des milieux de culture, une concentration en CO₂, une température et une humidité appropriées. Les lignées cellulaires établies devraient être périodiquement contrôlées du point de vue de la contamination par *Mycoplasme*.

Activation métabolique

Aucun système d'activation métabolique n'est utilisé pour des cultures primaires d'hépatocytes. Les lignées cellulaires établies et les lymphocytes sont exposés à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié.

Conduite de l'essai

Préparation des cultures

Des lignées cellulaires établies sont obtenues à partir de cultures souches (par exemple par trypsination ou par agitation), ensemencées dans des récipients de culture à une densité adéquate et incubées à 37 °C.

Des cultures à court terme d'hépatocytes de rat sont établies en permettant aux hépatocytes récemment dissociés dans un milieu approprié de s'attacher à la surface de croissance.

Les cultures de lymphocytes humains sont réalisées par des techniques appropriées.

Traitement des cultures avec la substance d'essai

Hépatocytes primaires de rat:

Des hépatocytes primaires de rat récemment isolés sont traités au moyen de la substance d'essai dans un milieu contenant ³H-TdR, pendant un laps de temps adéquat. À l'issue de la période de traitement, le milieu sera éliminé, les cellules seront rincées, fixées et séchées. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique [alternativement une pellicule photographique (*stripping film*) peut être utilisée], exposées, développées, colorées et comptées.

Lignées cellulaires établies et lymphocytes:

Techniques autoradiographiques: Les cultures cellulaires sont exposées à la substance d'essai pendant des périodes de temps adéquates, puis traitées à la ³H-TdR. La durée de l'exposition sera fonction de la nature de la substance, de l'activité du système métabolique et du type de cellules. Pour déceler l'acmé de «UDS», la ³H-TdR sera ajoutée soit en même temps que la substance d'essai, soit dans les quelques minutes qui suivent l'exposition à la substance d'essai. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques sera déterminé par d'éventuelles interactions entre la substance d'essai et la ³H-TdR. Afin de pouvoir faire la distinction entre l'UDS et la réplication semi-conservatrice de l'ADN, on peut inhiber cette dernière en utilisant, par exemple, un milieu déficient en arginine, une faible teneur en sérum ou en ajoutant de l'hydroxyurée dans le milieu de culture.

Mesures LSC de l'UDS: Avant de procéder au traitement avec la substance d'essai, l'entrée des cellules en phase S sera bloquée de la manière décrite ci-dessus; les cellules sont ensuite exposées à la substance d'essai comme décrit pour l'autoradiographie. À l'issue de la période d'incubation, l'ADN est extrait des cellules et la teneur totale en ADN ainsi que la quantité de ³H-TdR incorporée sont déterminées.

Il faut noter que lorsque des lymphocytes humains sont utilisés, il n'est pas nécessaire de supprimer la réplication semi-conservatrice de l'ADN dans des cultures non stimulées.

Analyse

Déterminations autoradiographiques

Pour déterminer l'UDS dans des cellules en culture, on ne compte pas les noyaux en phase S. Au moins 50 cellules par concentration seront comptées. Les lames seront codées avant comptage. Plusieurs champs choisis au hasard suffisamment éloignés les uns des autres seront comptés sur chaque lame. On déterminera la quantité de $^3\text{H-TdR}$ incorporée dans le cytoplasme en comptant trois surfaces de la taille du noyau dans le cytoplasme de chaque cellule comptée.

Détermination LSC

On devrait utiliser un nombre adéquat de cultures pour chaque concentration et pour les témoins lors des déterminations LSC-UDS.

Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. RÉSULTATS

Les résultats sont présentés sous la forme de tableaux.

2.1. Déterminations autoradiographiques

La quantité de $^3\text{H-TdR}$ incorporée dans le cytoplasme ainsi que le nombre de grains comptés par noyau cellulaire seront enregistrés séparément.

La moyenne, la médiane et le mode peuvent être utilisés pour décrire la distribution de la quantité de $^3\text{H-TdR}$ incorporée dans le cytoplasme ainsi que le nombre de grains par noyau.

2.2. Déterminations LSC

Pour les déterminations LSC, l'incorporation de $^3\text{H-TdR}$ sera indiquée sous la forme de dpm/ μg d'ADN. La moyenne des dpm/ μg d'ADN moyen avec son écart type peut être utilisé pour décrire la distribution de l'incorporation.

Les données devraient être évaluées par des méthodes statistiques appropriées.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- cellules utilisées, densité et nombre de passages au moment du traitement, nombre de cultures cellulaires,
- méthodes utilisées pour l'entretien des cultures cellulaires, y compris milieu, température et concentration en CO_2 ,
- substance d'essai, véhicule, concentration et justification du choix des concentrations utilisées dans l'essai,
- détails relatifs aux systèmes d'activation métabolique,
- schéma du traitement,
- témoins positifs et négatifs,

- technique autoradiographique utilisée,
- méthodes utilisées pour bloquer l'entrée des cellules en phase S,
- techniques utilisées pour extraire l'ADN et déterminer la quantité totale d'ADN dans les déterminations LSC,
- relation dose-réponse, si possible,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 19

ESSAI *IN VITRO* D'ÉCHANGE DE CHROMATIDES-SŒURS

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

L'essai d'échange des chromatides-sœurs (SCE) constitue un test à court terme destiné à détecter les échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides-sœurs d'un chromosome se dédoublant. Les SCE-s représentent l'échange réciproque de produits de réplication de l'ADN à des loci apparemment homologues. Le processus d'échange implique probablement une cassure et une réunion de l'ADN, bien que l'on sache peu de choses de sa base moléculaire. Pour détecter des SCE-s, il est nécessaire de pouvoir marquer différemment les chromatides-sœurs; ceci est rendu possible par l'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires.

Les cellules de mammifère *in vitro* sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère, le cas échéant, et mises en culture pendant deux cycles de réplication dans un milieu contenant de la BrdU. Après traitement avec un inhibiteur du fuseau (par exemple colchicine) afin d'accumuler les cellules en phase de mitose de type métaphasique (c-métaphase), les cellules sont récoltées et des préparations de chromosomes sont réalisées.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

- Des cultures primaires (lymphocytes humains) ou des lignées cellulaires établies (par exemple cellules ovariennes de hamsters chinois) peuvent être utilisées pour l'essai. Les lignées cellulaires seront contrôlées du point de vue de la contamination par des *Mycoplasmes*.
- Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés (par exemple température, récipients de culture, concentration en CO₂ et humidité) seront utilisés.
- Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans des milieux de culture soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. La concentration finale d'un véhicule dans le milieu de culture ne devrait pas affecter significativement la viabilité des cellules ou le taux de croissance et les effets sur la fréquence de SCE seront contrôlés à l'aide d'un solvant témoin.
- Les cellules seront exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère. Lorsqu'on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, le taux et la nature de l'activité devraient être appropriés à la classe chimique testée.

Conditions d'essai

Nombre de cultures

Deux cultures séparées au moins seront utilisées pour chaque point expérimental.

Utilisation de témoins positifs et négatifs

Des témoins positifs utilisant une substance à action directe et une substance nécessitant une activation métabolique devraient être inclus dans chaque expérience: un témoin devrait être également utilisé pour le véhicule.

Les substances ci-après peuvent par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

- substance à action directe:
 - méthanesulfonate d'éthyle,
- substance à action indirecte:
 - cyclophosphamide.

Le cas échéant, un témoin positif supplémentaire appartenant à la même classe chimique que la substance d'essai peut être inclus.

Concentration d'exposition

Au moins trois concentrations de la substance d'essai, convenablement espacées, devraient être utilisées. La concentration maximale produira un effet toxique significatif mais permettra encore une réplication cellulaire adéquate. Des substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de substances non toxiques franchement solubles dans l'eau, la concentration maximale de la substance d'essai devrait être déterminée cas par cas.

Conduite de l'essai

Préparation des cultures

Des lignées cellulaires établies sont obtenues à partir de cultures souches (par exemple par trypsinisation ou par agitation), ensemencées dans des récipients de culture à une densité adéquate et incubées à 37 °C. Dans le cas de cultures en couche monocellulaire, le nombre de cellules par récipient de culture devrait être ajusté de manière à ce que les cultures ne soient pas confluentes à plus de 50% au moment de la récolte. Les cellules peuvent également être utilisées sous une forme de culture en suspension. Les cultures de lymphocytes humains sont préparées à partir de sang hépariné, en utilisant des techniques appropriées, et incubées à 37 °C.

Traitement

Des cellules en phase exponentielle de croissance sont exposées à la substance d'essai pendant un laps de temps adéquat, dans la plupart des cas une à deux heures peuvent suffire, mais, dans certains cas, le traitement peut être prolongé pour couvrir jusqu'à deux cycles cellulaires complets. Les cellules n'ayant pas une activité métabolique intrinsèque suffisante devraient être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. À l'issue de la période d'exposition, les cellules sont lavées de manière à éliminer la substance d'essai et mises en culture, en présence de BrdU pendant deux cycles de réplication. Une autre méthode consiste à exposer simultanément les cellules à la substance d'essai et à la BrdU pendant deux cycles cellulaires complets.

Les cultures de lymphocytes humains sont traitées pendant qu'elles se trouvent dans un état semi-synchrone.

Les cellules sont analysées au cours de leur seconde division après traitement, garantissant ainsi l'exposition des phases les plus sensibles du cycle cellulaire à la substance d'essai. Toutes les cultures additionnées de BrdU seront manipulées dans l'obscurité ou sous un faible éclairage provenant de lampes incandescentes jusqu'au moment de la récolte des cellules, afin de réduire la photolyse de l'ADN contenant de la BrdU.

Récolte des cellules

Les cultures cellulaires sont traitées au moyen d'un inhibiteur du fuseau (par exemple colchicine) une à quatre heures avant leur récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément pour la préparation des chromosomes.

Préparation des chromosomes et coloration

Les préparations de chromosomes sont effectuées par des méthodes cytogénétiques standard. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour colorer les lames de manière à faire apparaître les SCE (par exemple la méthode par fluorescence plus Giemsa).

Analyse

Le nombre de cellules analysées sera fonction de la fréquence spontanée témoin de SCE. Habituellement, on analyse au moins 25 métaphases bien étalées par culture afin de compter les SCE. Les lames sont codées avant l'analyse. Pour les lymphocytes humains, seules les métaphases contenant 46 centromères sont analysées. Pour les lignées cellulaires établies, seules les métaphases contenant ± 2 centromères du nombre modal sont analysées. Il sera précisé si une inversion de coloration au niveau de centromère est considérée comme un SCE ou non. Les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux. Le nombre de SCE par métaphase et le nombre de SCE par chromosome sont donnés séparément pour toutes les cultures traitées et témoins.

Les résultats seront analysés par des méthodes statistiques adéquates.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- cellules utilisées, méthodes d'entretien de la culture cellulaire,
- conditions d'essai: composition des milieux, concentration en CO₂, concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, température d'incubation, temps de traitement, inhibiteur du fuseau utilisé, concentration et durée du traitement avec celui-ci, type de système d'activation de mammifère utilisé, témoins positifs et négatifs,
- nombre de cultures cellulaires par point expérimental,
- détails relatifs à la technique utilisée pour la préparation des lames,
- nombre de métaphases analysées (données indiquées séparément pour chaque culture),
- nombre de SCE par cellule et par chromosome (données indiquées séparément pour chaque culture),
- critère de comptage des SCE,
- justification du choix des doses,
- relation dose-réponse, si possible,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 20

TEST DE LÉTALITÉ RÉCESSIVE LIÉE AU SEXE SUR *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Le test de létalité récessive liée au sexe (*Sex-linked recessive lethal test*: SLRL) utilisant *Drosophila melanogaster* décèle l'apparition de mutations (mutations ponctuelles ainsi que petites délétions), dans la lignée germinale de l'insecte. Cette épreuve constitue un essai de mutation en avant permettant de déceler des mutations à environ 800 loci du chromosome X, soit environ 80 % de tous les loci du chromosome X. Le chromosome X représente approximativement un cinquième du génome haploïde complet.

Les mutations du chromosome X de *Drosophila melanogaster* sont phénotypiquement exprimées chez les mâles porteurs du gène mutant. Lorsque la mutation est létale à l'état hémizygotique, sa présence est déduite de l'absence d'un des groupes de descendance mâle sur les deux normalement produits par une femelle hétérozygote. L'épreuve SLRL exploite cette caractéristique en utilisant des chromosomes spécifiquement marqués et possédant des réarrangements de structure.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Stocks

Des mâles d'une lignée de type sauvage bien définie ainsi que des femelles contenant le chromosome Muller-5 peuvent être utilisés. D'autres lignées de femelles adéquatement marquées et porteuses de chromosomes X inversés de façon multiple peuvent également être utilisées.

Substance d'essai

Les substances d'essai sont dissoutes dans l'eau. Les substances insolubles dans l'eau peuvent être dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés (p. ex. un mélange d'éthanol et de Tween-60 ou 80), puis être diluées dans de l'eau ou dans une solution saline avant d'être administrées. L'utilisation de diméthylsulfoxyde comme véhicule devrait être évitée.

Nombre d'animaux

La sensibilité et la signification de l'essai seront prédéterminées. La fréquence de mutants spontanés observée dans le témoin approprié influencera fortement le nombre de chromosomes traités à analyser.

Voie d'administration

L'administration peut être orale, par injection ou par exposition à des gaz ou des vapeurs. L'ingestion de la substance d'essai peut se faire par l'intermédiaire d'une solution sucrée. Si nécessaire, les substances peuvent être dissoutes dans une solution à 0,7 % de NaCl et injectées dans le thorax ou l'abdomen.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins négatifs (véhicule) et positifs seront inclus. Toutefois, si le laboratoire dispose de données de contrôles historiques adéquats, des témoins simultanés ne sont pas nécessaires.

Niveau d'exposition

Trois niveaux d'exposition seront utilisés. Pour une première évaluation, on peut utiliser un seul niveau d'exposition de la substance d'essai, à savoir, soit la concentration maximale tolérée soit la concentration produisant certains signes de toxicité. Dans le cas de substances non toxiques, on devrait avoir recours à l'exposition à la concentration maximale praticable.

Conduite de l'essai

Des mâles de phénotype sauvage (âgés de 3 à 5 jours) sont traités avec la substance d'essai et individuellement accouplés à plusieurs femelles vierges de la lignée Muller-5 ou d'une autre porteuse d'un marqueur adéquat (à chromosomes X inversés de façon multiple).

Tous les deux à trois jours, ces femelles sont remplacées par d'autres femelles vierges afin de couvrir le cycle germinifère complet. La descendance de ces femelles est examinée afin de relever les effets létaux correspondant aux effets sur le sperme mature, les spermatozoïdes à des stades précoces, moyens ou tardifs, les spermatozoïdes et les spermatogonies au moment du traitement.

Les femelles F_1 hétérozygotes provenant des croisements susmentionnés sont accouplées individuellement (c'est-à-dire une femelle par flacon) avec leurs frères. À la génération F_2 , chaque culture est examinée afin de déceler l'absence de mâles du type sauvage. Si une culture s'avère provenir d'une femelle F_1 porteuse d'un gène létal sur le chromosome X parental (c'est-à-dire qu'aucun mâle porteur du chromosome traité n'est observé), les filles de cette femelle présentant le même génotype seront testées afin de vérifier si la létalité se répète dans la génération suivante.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous forme de tableaux afin de montrer le nombre de chromosomes testés, le nombre de mâles infertiles et le nombre de chromosomes létaux à chaque concentration d'exposition et à chaque période d'accouplement pour chaque mâle traité. Le nombre de groupes de tailles différentes par mâle est indiqué. Les résultats de l'essai seront confirmés au cours d'une expérience séparée.

Des méthodes statistiques appropriées seront utilisées pour évaluer le test de létalité récessive liée au sexe. Le regroupement de gènes létaux récessifs provenant d'un seul mâle sera pris en considération et évalué par une méthode statistique adéquate.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- lignée: lignées ou souches de drosophiles utilisées, âge des insectes, nombre de mâles traités, nombre de mâles stériles, nombre de cultures F_2 établies, nombre de cultures F_2 sans progéniture, nombre de chromosomes porteurs d'un gène létal décelé à chaque stade de la cellule germinale
- critères retenus pour déterminer la taille des groupes traités,
- conditions d'essai: description détaillée du programme de traitement et de prélèvement, niveau d'exposition, données relatives à la toxicité, témoins négatifs (solvant) et positifs, si nécessaire,
- critères de comptage des mutations létales,
- relation exposition/effet, si possible,
- évaluation des données,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 21

TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE *IN VITRO*

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Des systèmes de culture de cellules de mammifère peuvent être utilisés pour détecter des modifications phénotypiques *in vitro* induites par des substances chimiques associées à une transformation maligne *in vivo*. Parmi les cellules les plus fréquemment utilisées figurent C3H10T^{1/2}, 3T3, SHE, rat Fisher; les tests sont fondés sur des modifications de la morphologie cellulaire, la formation des foyers ou des modifications liées à la croissance ou non dans un agar semi-solide. Il existe des systèmes moins fréquemment utilisés qui détectent d'autres modifications physiologiques ou morphologiques dans les cellules à l'issue d'une exposition à des cancérogènes chimiques. Aucun des critères analysés dans ces tests *in vitro* n'a de relation mécanistique établie avec le cancer. Certains systèmes de tests sont capables de détecter des promoteurs de tumeur. On peut déterminer la cytotoxicité en mesurant l'effet de la substance d'essai sur les aptitudes à former une colonie (efficacité de clonage) ou sur les taux de croissance des cultures. La mesure de la cytotoxicité a pour but de déterminer si l'exposition à la substance d'essai a été toxicologiquement significative mais ne peut servir à calculer la fréquence des transformations dans toutes les épreuves, étant donné que certaines de celles-ci peuvent nécessiter une incubation prolongée et/ou un réensemencement.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Cellules

Suivant l'épreuve de transformation effectuée, diverses lignées cellulaires ou cellules primaires peuvent être utilisées. L'investigateur veillera à ce que les cellules utilisées pour l'épreuve présentent la modification phénotypique adéquate après exposition à des cancérogènes connus et à ce que la preuve de la validité et de la fiabilité de l'essai effectué dans le laboratoire de l'investigateur soient étayées par des documents.

Milieu

On utilisera des milieux et des conditions d'essai convenant à la méthode de transformation utilisée.

Substance d'essai

Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans des milieux de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. La concentration finale du véhicule dans le milieu de culture n'affectera ni la viabilité des cellules, ni le taux de croissance, ni l'incidence de transformation.

Activation métabolique

Les cellules sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système approprié d'activation métabolique de mammifère. Si l'on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, la nature de l'activité sera reconnue comme appropriée à la classe chimique testée.

Conditions d'essai

Utilisation de témoins positifs et négatifs

Des témoins positifs utilisant une substance à action directe et une substance nécessitant une activation métabolique seront inclus dans chaque expérience: un témoin négatif (véhicule) sera également utilisé.

Les substances ci-après peuvent, par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

- substances chimiques à action directe:
 - méthanesulfonate d'éthyle,
 - μ -propiolactone,
- substances nécessitant une activation métabolique:
 - 2-acétylamino-fluorène,
 - 4-diméthylaminoazobenzène,
 - 7,12-diméthylbenzo(a)anthracène.

Si cela se justifie, un témoin positif supplémentaire appartenant à la même classe chimique que la substance testée devrait être inclus.

Concentrations d'exposition

Plusieurs concentrations de la substance d'essai devraient être utilisées. Ces concentrations devraient produire un effet toxique en rapport avec la concentration, la concentration maximale produira un faible taux de survie, la concentration minimale un taux de survie voisin de celui observé pour le témoin négatif. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de substances non toxiques très solubles dans l'eau, la concentration maximale devrait être déterminée cas par cas.

Conduite de l'essai

Les cellules sont exposées pendant un laps de temps adéquat dépendant du système cellulaire utilisé, et ceci peut impliquer un nouveau traitement assorti d'un changement de milieu (et si nécessaire, un nouveau mélange d'activation métabolique) si l'exposition est prolongée. Les cellules n'ayant pas une activité métabolique intrinsèque suffisante devraient être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. À l'issue de la période d'exposition, les cellules sont lavées de manière à éliminer la substance testée et mises en culture dans des conditions permettant l'apparition du phénotype transformé étudié et l'incidence de cette transformation est déterminée. Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux et peuvent être combinés différemment suivant la méthode utilisée, par exemple comptage par boîte, boîtes positives ou nombre de cellules transformées. Le cas échéant, le taux de survie sera exprimé en pourcentage des taux témoins; la fréquence de transformation correspondra au nombre de cellules transformées par nombre de survivantes. Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- type de cellule utilisée, nombre de cultures cellulaires, méthodes d'entretien des cultures cellulaires,
- conditions d'essai: concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, temps d'incubation, durée et fréquence du traitement, densité cellulaire durant le traitement, type de système d'activation métabolique exogène utilisé, témoins positifs et négatifs, spécification du phénotype étudié, système sélectif utilisé (le cas échéant), justification du choix des doses,

- méthode utilisée pour compter les cellules viables et transformées,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 22

TEST DE LÉTALITÉ DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La létalité dominante provoque la mort de l'embryon ou du fœtus. L'induction de létalité dominante par exposition à une substance chimique indique que la substance a altéré le tissu germinifère de l'espèce étudiée. Il est généralement admis que la létalité dominante est imputable à une lésion chromosomique (anomalies structurales et numériques). Si les animaux traités sont des femelles, la mort de l'embryon peut également être due à des effets toxiques.

En général, les mâles sont exposés à la substance d'essai et accouplés avec des femelles vierges non traitées. Les différents stades des cellules germinales peuvent être testés séparément grâce à l'utilisation de périodes d'accouplement séquentielles. L'accroissement du nombre d'implants morts par femelle dans le groupe traité par rapport au nombre d'implants morts par femelle dans le groupe témoin reflète les pertes après implantation. Les pertes avant implantation peuvent être estimées par comptage des corps jaunes ou en comparant le nombre total d'implants par femelle dans le groupe traité et dans le groupe témoin. L'effet total de létalité dominante est égal à la somme des pertes avant et après implantation. Le calcul de l'effet total de la létalité dominante est basé sur la comparaison entre le nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe testé et celui enregistré pour le groupe témoin. Une réduction du nombre des implants à certaines périodes peut être due à la destruction de cellules (c'est-à-dire de spermatozoïdes et/ou de spermatogonies).

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Lorsque c'est possible, les substances d'essai sont dissoutes ou mises en suspension dans une solution saline isotonique. Les substances chimiques insolubles dans l'eau peuvent être dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Le véhicule utilisé ne devrait pas interférer avec la substance d'essai et ne devrait pas produire d'effets toxiques. Des préparations fraîchement réalisées de la substance d'essai sont utilisées.

Conditions d'essai

Voie d'administration

La substance d'essai ne devrait être généralement administrée qu'une seule fois. En fonction des informations toxicologiques disponibles, un programme de traitement répété peut être utilisé. Les voies d'administration habituelles sont l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Il est recommandé d'utiliser des rats ou des souris. De jeunes animaux ayant atteint leur pleine maturité sexuelle sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins.

Nombre et sexe

Un nombre adéquat de mâles traités est utilisé compte tenu de la variabilité spontanée du caractère biologique étudié. Le nombre retenu devrait être fondé sur la sensibilité de détection et le degré de signification qui ont été prédéterminés. Par exemple, dans une expérience type, le nombre de mâles retenus pour chaque groupe de dose devrait être suffisant pour obtenir environ 30 à 50 femelles gravides par période d'accouplement.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Généralement des témoins positifs et négatifs (véhicule) seront inclus simultanément dans chaque expérience. Si des expériences récentes effectuées dans le même laboratoire ont donné des résultats acceptables pour des témoins positifs, ces résultats peuvent être utilisés à la place d'un témoin positif simultané.

En ce qui concerne les substances témoins positives, on utilisera une dose faible appropriée (par exemple MMS, i.p., 10 mg/kg), afin de démontrer la sensibilité du test.

Doses

Normalement trois niveaux de dose sont utilisés. La dose élevée produira des signes de toxicité ou réduira la fécondité des animaux traités. Dans certains cas, un seul niveau de dose élevé peut suffire.

Épreuve limite

Les substances non toxiques sont testées à raison de 5 g/kg en cas d'administration unique et de 1 g/kg/jour en cas d'administration multiple.

Conduite de l'essai

Plusieurs schémas de traitement sont possibles. La méthode la plus fréquente est celle de l'administration unique. D'autres schémas de traitement peuvent être utilisés.

Chaque mâle est accouplé séquentiellement à 1 ou 2 femelles vierges non traitées à des intervalles de temps appropriés après le traitement. Les femelles devraient être laissées avec les mâles pendant au moins un cycle oestral complet ou jusqu'à ce que l'accouplement soit constaté par la présence de sperme dans le vagin ou la présence d'un bouchon vaginal.

Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinales traitées soient impliqués.

Les femelles sont sacrifiées durant la seconde moitié de leur gestation et le contenu de leur utérus est examiné, afin de déterminer le nombre d'implants vivants et morts. Les ovaires peuvent être examinés afin de déterminer le nombre de corps jaunes.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux indiquant le nombre de mâles, le nombre de femelles gravides ainsi que le nombre de femelles non gravides. Les résultats de chaque accouplement, y compris l'identité de chaque mâle et de chaque femelle, sont présentés séparément. Pour chaque femelle, la semaine d'accouplement et la dose reçue par les mâles ainsi que les fréquences d'implants vivants et morts sont rapportés. Le calcul de l'effet total de la létalité dominante est basé sur une comparaison du nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe testé avec le nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe témoin. Le rapport entre implants vivants et implants morts dans le groupe traité comparé avec le rapport correspondant dans le groupe témoin est analysé en vue d'indiquer la perte après implantation.

Si les résultats sont enregistrés sous la forme de mortalité précoce et de mortalité tardive, les tableaux devraient faire clairement ressortir cette différence. Si la perte avant implantation est évaluée, il y a lieu d'en présenter les résultats. Cette perte peut être exprimée par la différence entre le nombre de corps jaunes et le nombre d'implants ou par la réduction du nombre moyen d'implants par femelle par rapport aux accouplements témoins.

Les résultats sont évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèces, souche, âge et poids des animaux utilisés, nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,
- substance d'essai, véhicule, niveaux de dose testés et justification du choix des doses, témoins négatifs et positifs, données relatives à la toxicité,
- voie et programme de traitement,
- programme d'accouplement,
- méthode utilisée pour constater l'accouplement,
- moment du sacrifice,
- critères de comptage des effets de la létalité dominante,
- relation dose-réponse, si possible,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B.23. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFERE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 483, Essai d'aberration chromosomique sur des spermatogonies de mammifères (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai *in vivo* d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifère est destiné à détecter les substances qui causent des aberrations de structure dans les spermatogonies de mammifère (1, 2, 3, 4, 5). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des mutations chromatidiennes, mais des aberrations chromosomiques se produisent également. Cet essai n'est pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et n'est pas utilisé systématiquement dans ce but. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques humaines.

Cet essai évalue des atteintes chromosomiques qui surviennent dans les spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'induction de mutations transmissibles à la descendance dans les cellules germinales.

Pour cet essai, on utilise généralement des rongeurs. Cet essai cytogénétique *in vivo* détecte des aberrations chromosomiques dans les spermatogonies en mitose. D'autres cellules cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Afin de détecter des aberrations chromatidiennes dans les spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations ne disparaissent lors des divisions cellulaires ultérieures. L'analyse de chromosomes méiotiques peut fournir des informations complémentaires utiles; elle est destinée à mettre en évidence des aberrations de type chromosomique aux stades de la diacinèse-métaphase I, lorsque les cellules traitées se transforment en spermatocytes.

Cet essai *in vivo* est conçu pour vérifier si les mutagènes actifs sur les cellules somatiques se ont également sur les cellules germinales. L'essai sur spermatogonies se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, puisqu'il permet de tenir compte de facteurs de métabolisme *in vivo*, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN.

Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies présentant des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées représentent une réponse globale des populations de spermatogonies traitées, dans lesquelles les cellules différenciées, plus nombreuses, prédominent. En fonction de leur position dans le testicule, les différentes générations de spermatogonies sont ou non exposées aux substances présentes dans la circulation générale en raison de la barrière physique et physiologique des cellules de Sertoli et de la barrière sang-testicule.

L'utilisation de cet essai ne convient pas s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Aberration de type chromatidien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Lacune: une lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre: une modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polyplôidie: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire $3n$, $4n$ etc.).

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple la colchicine ou Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Préparations

1.4.1.1 *Sélection des espèces animales*

On utilise communément des hamsters chinois et des souris. Des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés. Il convient d'utiliser des animaux adultes jeunes et sains, issus de souches de laboratoire courantes. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne doit pas excéder $\pm 20\%$ du poids moyen.

1.4.1.2 *Conditions de stabulation et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60%.

1.4.1.3 *Préparation des animaux*

De jeunes mâles sains sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

1.4.1.4 Préparation des doses

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2 Conditions expérimentales

1.4.2.1 Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2 Témoins

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent accompagner chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure *in vivo* dans les spermatogonies lorsqu'ils sont administrés à des niveaux d'exposition supposés produire un accroissement détectable par rapport au bruit de fond.

Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	N° CAS	N° EINECS
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide monomère	79-06-1	201-173-7
Triéthylèneméline	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

1.5 MODE OPERATOIRE

1.5.1 Nombre d'animaux

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comporter au moins cinq mâles analysables.

1.5.2 Modalités de traitement

La substance d'essai est de préférence administrée en une seule fois ou en deux fois (c'est-à-dire en un seul ou deux traitements). Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modes d'administration doivent être scientifiquement justifiés.

Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, deux prélèvements d'échantillons sont effectués après le traitement. La cinétique cellulaire pouvant être influencée par la substance d'essai, le premier et le deuxième prélèvement ont lieu respectivement environ 24 heures et 48 heures après le traitement. Pour les autres doses, le prélèvement est effectué après 24 heures ou 1,5 cycle cellulaire après le traitement, à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement plus propice à la détection des effets (6).

D'autres temps de prélèvement peuvent être employés. Par exemple, dans le cas de substances chimiques qui pourraient induire des chromosomes retardataires ou d'avoir des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (1).

La pertinence d'un traitement répété doit être évaluée au cas par cas. Après un traitement répété, les animaux doivent être sacrifiés 24 heures (1,5 cycle cellulaire) après le dernier traitement. De plus, d'autres temps de prélèvements peuvent être employés si nécessaire.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un agent bloquant la métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Ce délai est d'environ 3-5 heures pour la souris et de 4-5 heures environ pour le hamster chinois.

1.5.3 Niveaux de dose

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et le même schéma de traitement que ceux de l'étude principale (7). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de doses doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant le même mode d'administration, seraient létales.

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les spermatogonies (par exemple une diminution des mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique; cette diminution ne devrait pas dépasser 50 %).

1.5.4 **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans le test limite.

1.5.5 **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6 **Préparation des chromosomes**

Des suspensions cellulaires obtenues à partir d'un ou des deux testicules immédiatement après le sacrifice sont exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules sont ensuite étalées sur des lames et colorées.

1.5.7 **Analyse**

Au moins 100 cellules en métaphase bien étalées sont analysées par animal (soit un minimum de 500 métaphases par groupe d'essai). Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoquant souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte de chromosomes, les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. **RESULTATS**

2.1 **TRAITEMENT DES RESULTATS**

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure et le nombre d'aberrations par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

Lorsqu'on observe des mitoses et des méioses, il faut, en vue de mettre en évidence un éventuel effet cytotoxique, déterminer le rapport entre le taux de mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique pour tous les animaux traités et les témoins négatifs dans un échantillon total de 100 cellules en division par animal. Dans le cas où seules des mitoses sont observées, l'index mitotique doit être déterminé dans au moins 1000 cellules de chaque animal.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul moment de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (8) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai *in vivo* d'aberration chromosomique sur spermatogonies indiquent que la substance induit des aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites n'atteignent pas le tissu cible devrait être discutée.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre et âge des animaux,
- source, conditions de stabulation, régime alimentaire, etc.,
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- justification du choix de la voie d'administration,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix des moments de sacrifice,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,
- description détaillée des schémas de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- nature et concentration de l'inhibiteur de la métaphase et durée du traitement,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

- signes de toxicité,
- index mitotique,
- taux de mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique,
- type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,
- nombre total d'aberrations par groupe,
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données sur les témoins négatifs concomitants,
- données sur les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- données sur les témoins positifs concomitants,
- changements de la ploïdie, le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
3. Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.
6. Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
7. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.
8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 24
SPOT TEST CHEZ LA SOURIS

1. **MÉTHODE**

1.1. **Introduction**

Voir introduction générale, partie B.

1.2. **Définition**

Voir introduction générale, partie B.

1.3. **Substances de référence**

Néant.

1.4. **Principe de la méthode d'essai**

Il s'agit d'une épreuve *in vivo* effectuée sur souris dont les embryons en développement sont exposés à la substance d'essai. Les cellules visées des embryons en développement sont des mélanoblastes et les gènes cibles sont ceux responsables de la pigmentation des poils. Les embryons en développement sont hétérozygotes pour un certain nombre de ces gènes. Une mutation au niveau de l'allèle dominant ou la perte de l'allèle dominant (suite à divers événements génétiques) d'un tel gène dans un mélanoblaste se traduit par l'expression du phénotype récessif dans les cellules qui en sont issues, ce qui entraîne l'apparition d'une tache d'une autre couleur dans le pelage de la souris nouveau-née. Le nombre de descendants porteurs de taches (mutations) est compté et la fréquence de celles-ci est comparée à celle observée pour la descendance issue des embryons traités uniquement avec le solvant. Le *spot test* chez la souris décele des mutations présumées somatiques au niveau des cellules fœtales.

1.5. **Critère qualitatif**

Néant.

1.6. **Description de la méthode d'essai**

Préparations

Lorsque c'est possible, les substances d'essai sont dissoutes ou mises en suspension dans une solution saline isotonique. Les substances insolubles dans l'eau sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Le véhicule utilisé ne devrait pas interférer avec la substance d'essai et ne devrait pas produire d'effets toxiques. Des préparations de la substance d'essai fraîchement réalisées seront utilisées.

Animaux d'expérience

Des souris de la souche T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{chp}/c^{chp} ; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d; piebald spotting, s/s) sont accouplées soit avec la souche HT (pallid, nonagouti, brachypodie, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) ou avec C57 BL (nonagouti, a/a). D'autres croisements appropriés tels que NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) et DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d) peuvent être utilisés à condition de donner une descendance nonagouti.

Nombre et sexe

On traite un nombre suffisant de femelles gravides de manière à obtenir un nombre adéquat de descendants vivants pour chaque dose utilisée. La taille de l'échantillon dépend du nombre de taches observées chez les souris traitées ainsi que l'importance du nombre de données témoins. Un résultat négatif ne peut être accepté que si au moins 300 descendants de femelles traitées avec la dose maximale ont été examinés.

Témoins négatifs et positifs

Simultanément, on devrait disposer de résultats de souris traitées uniquement avec le véhicule (témoins négatifs). Des données témoins historiques provenant du même laboratoire peuvent être rassemblées afin d'améliorer la sensibilité de l'essai, à condition que ces données soient homogènes, à l'issue d'un traitement avec un produit

chimique réputé mutagène dans cet essai. Si la substance d'essai ne se révèle pas mutagène, des données obtenues récemment par le même laboratoire pour un contrôle positif connu pour être mutagène dans cette épreuve devraient être disponibles.

Voie d'administration

Les voies d'administration habituelles sont l'intubation orale et l'injection péritonéale des femelles gravides. Le traitement par inhalation ou d'autres voies d'administration est utilisé, le cas échéant.

Doses

On utilise au moins deux doses dont une faisant apparaître des signes de toxicité ou réduisant la taille des portées. Dans le cas de substances non toxiques, on aura recours à un traitement à la dose maximale utilisable.

Conduite de l'épreuve

Un traitement unique est normalement administré aux huitième, neuvième et dixième jours de gestation, le jour 1 étant le jour où l'on observe pour la première fois la présence d'un bouchon vaginal. Ces jours correspondent à 7,25, 8,25 et 9,25 jours après la conception. Des traitements successifs peuvent être effectués pendant ces jours.

Analyse

Trois à quatre semaines après la naissance, la descendance est codée et examinée pour la présence de taches. On distingue trois classes de taches:

- a) les taches blanches situées à moins de 5 mm de la ligne médio-ventrale présumées résulter de mort cellulaire (WMVS);
- b) les taches jaunes, de type agouti, associées aux mamelles, aux organes sexuels, à la gorge, aux régions axillaire et inguinale ainsi qu'au milieu du front, présumées être dues à un manque de différenciation (MDS)
et
- c) les taches pigmentées et blanches, réparties au hasard sur le pelage, présumées être dues à des mutations somatiques (RS).

Les trois classes sont comptées mais seule la dernière c'est-à-dire RS, a une signification génétique. Les problèmes que pose la distinction entre les types MDS et RS peuvent être résolus en examinant des échantillons de poils au microscope à fluorescence.

Les anomalies morphologiques macroscopiques évidentes observées sur la descendance seront notées.

2. RÉSULTATS

Les résultats sont présentés en donnant le nombre total de jeunes examinés et le nombre de jeunes présentant une ou plusieurs taches présumées être dues à une mutation somatique. Les résultats sont également présentés en se référant à la portée comme unité. Les résultats relatifs aux animaux traités et aux témoins négatifs sont comparés par des méthodes statistiques appropriées.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- souches utilisées dans le croisement,
- nombre de femelles gravides dans les groupes traités et témoins,
- taille moyenne des portées dans les groupes traités et témoins à la naissance et au sevrage,
- doses de la substance d'essai,
- solvant utilisé,

- jour de la gestation auquel le traitement est administré,
- voie d'administration,
- nombre total de jeunes examinés ainsi que le nombre de ceux présentant une WMVS, MDS et RS dans les groupes traités et témoins,
- anomalies morphologiques macroscopiques,
- relation dose/effet de RS si possible,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 25

TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principes de la méthode d'essai

L'épreuve de translocation héréditaire chez la souris décèle des changements chromosomiques structurels et numériques dans les cellules germinales de mammifères tels qu'ils sont mis en évidence dans la descendance de première génération. Les types de changements chromosomiques détectés sont des translocations réciproques et, si la descendance femelle est incluse, la perte du chromosome X. Les porteurs de translocations et les femelles XO présentent une fertilité réduite permettant la sélection d'une descendance F_1 en vue d'une analyse cytogénétique. Une stérilité totale est due à certains types de translocations (autosome X et type c-t). Les translocations sont observées cytogénétiquement dans les cellules méiotiques en diachèse-métaphase I des individus mâles, qu'il s'agisse de mâles F_1 ou de fils de femelles F_1 . Les femelles XO sont identifiées cytogénétiquement par la présence de 39 chromosomes seulement dans des mitoses de la moelle osseuse.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les substances d'essai sont dissoutes dans une solution saline isotonique. Si elles sont insolubles dans l'eau, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. On utilise des solutions fraîchement préparées de la substance d'essai. Si un véhicule est utilisé pour faciliter le traitement, il ne doit pas interférer avec la substance d'essai et ne pas produire d'effets toxiques.

Voie d'administration

Les voies d'administration sont habituellement l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Pour faciliter l'élevage et la vérification cytologique, ces expériences sont effectuées avec des souris. Aucune souche spécifique de souris n'est requise. Toutefois, la taille moyenne d'une portée de la souche utilisée devra être supérieure à 8 et être relativement constante. Des animaux sains ayant atteint leur maturité sexuelle seront utilisés.

Nombre d'animaux

Le nombre d'animaux nécessaires dépend de la fréquence de translocations spontanées ainsi que du taux minimal d'induction requis pour un résultat positif.

L'essai consiste habituellement en une analyse de la descendance mâle F_1 . Au moins 500 descendants mâles F_1 sont restés par groupe de dose. Si la descendance femelle F_1 est incluse, 300 mâles et 300 femelles sont nécessaires.

Contrôles

Des résultats de contrôles adéquats provenant d'épreuves réalisées simultanément et de contrôles historiques doivent exister. S'il existe des résultats acceptables de contrôles positifs provenant d'expériences récemment effectuées dans le même laboratoire, ces résultats peuvent être utilisés à la place de contrôles positifs simultanés.

Doses

Une dose est testée, il s'agit habituellement de la dose maximale associée à la production d'effets toxiques minimaux mais n'affectant pas le comportement reproducteur ou la survie. Pour établir une relation dose/réponse, deux autres doses plus faibles sont nécessaires. Dans le cas de substances non toxiques, on devrait avoir recours à une exposition à la dose maximale possible.

Conduite de l'essai

Traitement et accouplement

Deux programmes de traitement existent. L'administration unique de la substance d'essai est la méthode la plus fréquente. La substance d'essai peut également être administrée 7 jours sur 7 pendant 35 jours. Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinales traitées soient impliqués. À l'issue de la période d'accouplement, les femelles sont placées dans des cages individuelles. Lorsqu'elles ont mis bas, la date, la taille de la portée et le sexe des jeunes sont enregistrés. Toute la descendance mâle est sevrée et toute la descendance femelle est écartée à moins d'être incluse dans l'expérience.

Recherche des hétérozygotes de translocation

On utilise une des deux méthodes disponibles:

- analyse de la fécondité de la descendance F_1 et vérification ultérieure d'éventuels porteurs de translocations par analyse cytogénétique,
- analyse cytogénétique de tous les mâles F_1 sans sélection préalable par vérification de la fécondité.

a) Analyse de la fécondité:

La fécondité réduite d'un individu F_1 peut être déterminée en observant la taille de la portée et/ou en analysant le contenu utérin des partenaires femelles.

Il y a lieu de fixer les critères de détermination de la fécondité normale et réduite de la souche de souris utilisée.

Observation de la taille de la portée: Les mâles F_1 à tester sont placés dans des cages individuelles avec des femelles provenant soit de la même expérience soit de la colonie. Les cages sont inspectées quotidiennement à partir du dix-huitième jour qui suit l'accouplement. La taille de la portée et le sexe de la descendance F_2 sont enregistrés au moment de la naissance et les jeunes sont ensuite éliminés. Si la descendance femelle F_2 est testée, les descendants F_2 provenant de petites portées sont conservés en vue d'une analyse plus approfondie. Les femelles porteuses de translocation font l'objet d'une vérification par analyse cytogénétique d'une translocation dans n'importe lequel de leurs descendants mâles. Les femelles XO sont identifiées par la modification du rapport des sexes dans leur descendance, rapport qui passe de 1:1 à 1:2 mâles/femelles. Dans une méthode séquentielle, les animaux F_1 normaux ne font pas l'objet d'une autre vérification si la première portée F_2 atteint ou dépasse une valeur normale prédéterminée, sinon une deuxième ou une troisième portée F_2 sont observées. Les animaux F_1 qui ne peuvent pas être classés comme normaux après observation de jusqu'à trois portées F_2 maximum sont soit soumis à un nouveau contrôle par le biais d'une analyse du contenu utérin de leurs partenaires femelles soit directement soumis à une analyse cytogénétique.

Analyse du contenu utérin: La réduction de la taille des portées chez les porteurs de translocation est due à la mort des embryons, de sorte qu'un grand nombre d'implants morts indique la présence d'une translocation chez l'animal soumis au test. Chaque mâle F_1 à tester est accouplé à 2 ou 3 femelles. On constate la conception en examinant les femelles tous les matins afin de déceler la présence de bouchons vaginaux. Les femelles sont sacrifiées 14 à 16 jours plus tard et le nombre d'implants vivants et morts présents dans leur utérus est enregistré.

b) Analyse cytogénétique:

Les préparations de testicules sont effectuées par la méthode de séchage à l'air. Les porteurs de translocations sont identifiés par la présence de configurations multivalentes en diacinese métaphase I dans les spermatozoïdes primaires. L'observation d'au moins 2 cellules présentant une association multivalente constitue la preuve nécessaire que l'animal testé est porteur d'une translocation.

Si aucune sélection par analyse de fécondité n'a été effectuée, tous les mâles F₁ sont soumis à un examen cytogénétique. Un minimum de 25 diacynèses métaphases I par mâle doivent être analysées au microscope. L'examen des métaphases mitotiques, des spermatogonies ou de la moelle osseuse est requise pour les mâles F₁ ayant de petits testicules et présentant un arrêt méiotique avant diacynèse ou pour les femelles F₁ suspectées d'être XO. La présence inhabituelle d'un chromosome long et/ou court dans 10 cellules est la preuve d'une translocation particulière entraînant la stérilité du mâle (type c-t). Quelques translocations X autosomes provoquant la stérilité du mâle peuvent uniquement être identifiées par une analyse des bandes de chromosomes mitotiques. La présence de 39 chromosomes dans 10 mitoses sur 10 est la preuve d'un état XO chez une femelle.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux.

La taille moyenne des portées et le rapport entre les sexes sont enregistrés à la naissance et au sevrage pour chaque période d'accouplement.

Lors de l'évaluation de la fécondité des animaux de F₁, la taille moyenne des portées issues de tous les accouplements normaux ainsi que la taille individuelle des portées issues d'animaux F₁ porteurs de translocation sont présentées. En ce qui concerne l'analyse du contenu utérin, le nombre moyen d'implants vivants et morts issus d'accouplements normaux et le nombre d'implants vivants et morts pour chaque accouplement de porteurs de translocation F₁ sont notés.

Lors de l'analyse cytogénétique de la diacynèse-métaphase I, le nombre des différents types de configurations multivalentes et le nombre total de cellules sont relevés pour chaque porteur de translocation.

Pour les individus stériles F₁, le nombre total d'accouplements et la durée de la période d'accouplement sont indiqués. Le poids des testicules et les détails de l'analyse cytogénétique sont indiqués.

Pour les femelles XO, on indique la taille moyenne de la portée, le rapport entre les sexes dans la descendance F₂ ainsi que les résultats de l'analyse cytogénétique.

Si d'éventuels porteurs de translocation F₁ sont présélectionnés par des tests de fécondité, les tableaux mentionneront combien parmi eux ont été confirmés comme étant des hétérozygotes de translocation.

Les données relatives aux témoins négatifs ainsi que les expériences témoins positives sont présentées.

3. **RAPPORT**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- souche de souris, âge des animaux, poids des animaux traités,
- nombre d'animaux parents de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,
- conditions d'essai, description détaillée du traitement, doses, solvants, programme d'accouplement,
- nombre et sexe des jeunes par femelle, nombre et sexe des jeunes élevés en vue d'une analyse de translocation,
- moment et critères de l'analyse de translocation,
- nombre et description détaillée des porteurs de translocation, y compris données relatives à l'élevage et au contenu utérin, si possible,
- méthodes cytogénétiques et détails de l'analyse microscopique, de préférence avec clichés,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B.26. ESSAI DE TOXICITE SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE

TOXICITE ORALE A DOSES REPETEES – RONGEURS : 90 JOURS

1. METHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 408 de l'OCDE (1998).

1.1 INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition répétée durant une période prolongée, qui la période qui s'étend du sevrage jusqu'à l'état adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la Dose Sans Effet Toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode accorde davantage d'importance aux effets neurologiques et donne des indications relatives aux effets sur le système immunitaire et sur la reproduction. Elle insiste également sur la nécessité d'observer très attentivement les animaux sur le plan clinique, en vue d'obtenir le plus d'informations possible. Cette étude devrait permettre de repérer les produits chimiques susceptibles d'avoir une action neurotoxique ou des effets sur le système immunitaire ou les organes reproducteurs, pouvant justifier des études plus approfondies.

Voir également Introduction générale Partie B.

1.2 DÉFINITIONS

Dose : quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

Dosage : terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

DSET : abréviation de Dose Sans Effet Toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level) c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'un niveau de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration, afin de déceler d'éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés; au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

1.4 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1 **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux en bonne santé, ayant été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et qui n'ont pas encore été sujets d'expériences. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et les groupes témoins. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. Un numéro d'identification unique est attribué à chaque animal.

1.4.2 **Préparation des doses**

La substance d'essai est administrée par gavage ou dans les aliments ou dans l'eau de boisson. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

1.4.3 **Conditions d'essai**

1.4.3.1 *Animaux d'expérience*

L'espèce préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs, notamment la souris, puissent être utilisées. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes, sains, issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et en aucun cas au-delà de l'âge de neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder $\pm 20\%$ de la moyenne du poids de chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

1.4.3.2 *Nombre et sexe*

Au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur un produit de structure très proche, on pourra envisager d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer, une fois la période de traitement terminée, la persistance ou la réversibilité de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement devrait être fixée en fonction des effets observés.

1.4.3.3 *Niveaux de dose*

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.4.3.4). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées ou d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimique de la substance ou à ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort, ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une Dose Sans Effet Toxique (DSET) à la dose la plus faible. 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 (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

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 de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être 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. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations toxicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas : effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai ; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité ; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.3.4 *Essai limite*

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées .

1.5 **MODE OPÉRATOIRE**

1.5.1 **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.2 Observations

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Deux fois par jour au minimum, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Ils doivent être soigneusement consignés, de préférence en utilisant un système de notation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes relevés devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréctions, ainsi que l'activité autonome (sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres (par exemple, auto-mutilation, marche à reculons) (1).

A l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on détecte des changements dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

Vers la fin de la période d'exposition, mais en aucun cas avant la onzième semaine, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (1) (auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (2) (3) (4), et évaluer la force de préhension (5) et l'activité motrice (6). Des détails supplémentaires sur les méthodes utilisables figurent dans les références respectives. Des méthodes non décrites dans les références peuvent aussi être appliquées.

Les observations fonctionnelles préconisées vers la fin de l'étude ne sont pas indispensables si on dispose d'observations fonctionnelles provenant d'autres études et que les examens cliniques quotidiens n'ont pas révélé de troubles fonctionnels.

Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

1.5.2.1 *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

1.5.2.2 *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. A la fin de la période d'essai, des prélèvements sont réalisés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

On procédera aux examens hématologiques suivants au terme de la période d'essai et sur les prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des leucocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps de coagulation.

Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur chaque animal juste avant son sacrifice ou au cours de celui-ci (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai). A l'instar des examens hématologiques, les analyses de biochimie clinique peuvent être conduites sur des échantillons de sang prélevés en cours d'essai. Il est recommandé de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang¹. Les analyses effectuées sur le plasma ou le sérum devraient comprendre le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, l'azote uréique du sang, la créatinine, les concentrations totales de protéines et d'albumine et plus de deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyle transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Des mesures d'activités enzymatiques supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, peuvent également être incluses.

Les analyses d'urine suivantes peuvent être réalisées, à titre facultatif, au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés : apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

Il faut envisager par ailleurs de rechercher les indicateurs sériques de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter des courbes métaboliques connexes, d'autres analyses devraient être pratiquées, notamment celles du calcium, du phosphore, des triglycérides à jeun, d'hormones spécifiques, de la méthémoglobine et de la cholinestérase. Ces analyses doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

Si les données historiques sont insuffisantes, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres d'hématologie et de biochimie clinique avant de commencer l'étude; il est généralement déconseillé d'obtenir ces données avant le traitement (7).

¹ Pour un certain nombre de paramètres mesurés dans le sérum ou le plasma, et particulièrement pour le glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang, et ce, essentiellement afin d'éviter l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement de la prise de nourriture et qui aurait tendance à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation difficile. Cependant, le jeûne des animaux durant une nuit entière peut influencer sur leur métabolisme général et risque, notamment dans les études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on a choisi de faire jeûner les animaux toute la nuit, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles de l'étude.

1.5.2.3 *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, l'utérus, les ovaires, le thymus, la rate, le cerveau et le coeur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter lent dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux : cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'oesophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le coeur, la trachée et les poumons (traités par gonflement avec un fixateur, puis immergés), l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, la vésicule biliaire (souris), les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatique ou poplitée interne) de préférence proche du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ ou ponction de moelle osseuse examinée directement), la peau et les yeux (si des changements ont été relevés au cours des examens ophtalmologiques). Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.2.4 *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1 **RÉSULTATS**

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasies, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité et une description des symptômes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques doivent être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser doit intervenir au stade de rédaction du protocole d'étude.

2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes

2.2.1 Substance d'essai :

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques;
- données permettant l'identification chimique;
- véhicule (le cas échéant) justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

2.2.2 Animaux d'expérience :

- espèce et souche utilisée;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3 Conditions d'essai

- justification du choix des doses;
- détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai;
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu;
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4 Résultats :

- poids corporel et variation de poids corporel;
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant;
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité;
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non);
- résultats de l'examen ophtalmologique;
- évaluations de l'activité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice (le cas échéant);
- paramètres hématologiques et valeurs normales de référence;
- paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence;
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel;
- résultats d'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques;
- données relatives à l'absorption, le cas échéant;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document n°. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health.* 9, 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Philips, 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.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Environ. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (6) 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.
- (7) 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.

B.27. ESSAI DE TOXICITE SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE
TOXICITE ORALE A DOSES REPETEES NON-RONGEURS : 90 JOURS

1. **METHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 409 de l'OCDE (1998).

1.1 **INTRODUCTION**

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer, après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition répétée durant une période de croissance rapide jusqu'au début de l'âge adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la Dose Sans Effet Toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode d'essai permet de mettre en évidence les effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques chez des non-rongeurs; elle ne doit être utilisée que dans les cas suivants:

- lorsque les effets observés dans d'autres études font ressortir la nécessité d'éclaircir et de préciser certains points chez une deuxième espèce non- rongeurs, ou
- lorsque les études toxicocinétiques montrent que l'utilisation d'une espèce particulière de non-rongeur constitue le choix le plus pertinent en tant qu'animal d'expérience ou
- lorsque d'autres raisons précises justifient l'utilisation d'une espèce de non-rongeur.

Voir également Introduction générale Partie B.

1.2 **DÉFINITIONS**

Dose : quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

Dosage : terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

DSET : abréviation de Dose Sans Effet Toxique (NOAEL : No Observable Adverse Effect Level) c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3 **PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement, afin de déceler d'éventuels symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

1.4 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1 Sélection de l'espèce animale

L'espèce non-rongeur couramment utilisée est le chien, dont la race doit être définie; on se sert fréquemment du beagle. D'autres espèces, par exemple le porc ou le porc nain (mini porc), peuvent aussi être utilisées. Les primates ne sont pas recommandés et leur utilisation doit être justifiée. Il convient d'employer de jeunes animaux en bonne santé et, dans le cas du chien, l'administration de la substance à tester devrait commencer de préférence à l'âge de 4-6 mois, et jamais au delà de 9 mois. Lorsque l'étude est préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser la même espèce et la même race dans les deux études.

1.4.2 Préparation des animaux

Il convient d'utiliser de jeunes animaux, en bonne santé, acclimatés aux conditions du laboratoire et n'ayant pas encore été sujets d'expérience. La durée de l'acclimatation dépendra de l'espèce d'essai sélectionnée et de sa provenance. Il est recommandé de compter au moins 5 jours pour les chiens ou les porcs élevés à cette fin dans une animalerie résidente et au moins deux semaines pour ces mêmes animaux s'ils proviennent de sources extérieures. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. Un numéro d'identification distinct doit être attribué à chaque animal.

1.4.3 Préparation des doses

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou dans l'eau de boisson, par gavage ou dans des capsules. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

1.5 MODE OPÉRATOIRE

1.5.1 Nombre et sexe des animaux

Il faut employer au moins huit animaux (quatre femelles et quatre mâles) à chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. Le nombre d'animaux survivants au terme de l'étude doit être suffisant pour permettre une évaluation significative des effets toxiques. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur une substance de structure très proche, on envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de huit animaux (quatre par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la concentration la plus élevée, en vue d'observer, une fois la période de traitement écoulée, la réversibilité ou la persistance de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement doit être fixée en fonction des effets observés.

1.5.2 **Dosage**

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.5.3). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai ou par ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort, ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi que la dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. 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 (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

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 de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être 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. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations lexicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5.3 **Essai limite**

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5.4 **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume devrait normalement être le plus petit possible. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage ou dans une capsule, la dose doit être administrée aux mêmes heures chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.5 Observations

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Au moins deux fois par jour, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués, si possible, hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes de toxicité doivent être soigneusement notés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité. Les observations devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréments, ainsi que l'activité autonome (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres.

A l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements liés au traitement dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

1.5.5.1 *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

1.5.5.2 *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. A la fin de la période d'essai, des échantillons sont prélevés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

Au début de l'essai et, par la suite, soit tous les mois, soit à partir du milieu de la période d'essai et à la fin de celle-ci, il y a lieu d'effectuer un examen hématologique en mesurant l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, la numération des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire, la numération des plaquettes et l'étude de paramètres de la coagulation tels que le temps de coagulation, le temps de prothrombine ou le temps de thromboplastine.

Des analyses de biochimie clinique destinées à l'étude des principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux, au début de l'essai et ensuite soit tous les mois, soit au milieu et à la fin de l'essai. Les paramètres qui doivent être analysés comprennent l'équilibre électrolytique, le métabolisme des glucides et les fonctions hépatiques et rénales. Le choix de certaines analyses dépendra des observations sur le mode d'action de la substance d'essai. Les animaux doivent être mis à jeun durant une période dépendant de l'espèce la prise de sang. Les analyses proposées comprennent le calcium, le phosphore, le chlore, le sodium, le potassium, le glucose à jeun, l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, l'ornithine décarboxylase, la gamma glutamyle transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine sanguine et les concentrations totales de bilirubine et de protéines sériques.

Les analyses d'urine doivent être pratiquées au moins au début, au milieu et en fin d'essai, sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés. Les paramètres à relever sont l'apparence, le volume, l'osmolalité ou la densité, le pH, les protéines, le glucose, le sang et les cellules sanguines. Des paramètres supplémentaires peuvent être étudiés, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés.

Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher des indicateurs de lésions générales des tissus. D'autres déterminations pourraient être nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate : l'analyse des lipides, des hormones, de l'équilibre acido-basique, de la méthémoglobine et de l'inhibition de la cholinestérase. Des analyses de biochimie clinique supplémentaires peuvent être pratiquées, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés. Celles-ci doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

1.5.5.3 *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie et la vésicule biliaire, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, les ovaires, l'utérus, la thyroïde (et les glandes parathyroïdes) le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux : cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, les yeux, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons, l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage, afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatiques ou tibiaux), de préférence proche du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ ou une ponction de moelle osseuse examinée directement) et la peau. Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des organes cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.5.4 *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au moins au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1 **RÉSULTATS**

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, 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 symptômes de toxicité et une description des signes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser devrait intervenir au stade de la rédaction du protocole d'étude.

2.2 **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes

2.2.1 **Substance d'essai**

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques;
- données permettant l'identification chimique;
- véhicule (le cas échéant); justification du choix si autre que l'eau.

2.2.2 **Animaux d'expérience :**

- espèce et souche utilisée;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3 **Conditions d'essai :**

- justification du choix des doses;
- détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai;
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu;
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4

Résultats :

- poids corporel et variation de poids corporel;
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant;
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité;
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non);
- résultats de l'examen ophtalmologique;
- paramètres hématologiques et valeurs normales de référence;
- paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence;
- poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel;
- résultats d'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques;
- données relatives à l'absorption, le cas échéant;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

B. 28
TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE

ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS

1. MÉTHODE

1.1 Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Les doses croissantes de la substance d'essai sont appliquées quotidiennement, sur la peau des animaux de plusieurs lots d'expérience, à raison d'une dose par lot durant une période de 90 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience de même que ceux encore en vie à l'issue de celle-ci sont autopsiés.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Peu de temps avant l'essai, on tond la fourrure de la région dorsale des animaux. On peut avoir recours au rasage, mais l'opération doit alors être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est habituellement nécessaire de répéter ces opérations toutes les semaines environ et il faut prendre grand soin d'éviter toute lésion de la peau pendant ces opérations. La surface à dégager pour l'application de la substance à tester ne sera pas inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal sera pris en compte pour décider de la zone à dégager et des dimensions de la surface à traiter. Lorsque l'essai porte sur des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement testées sans dilution préalable. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

Conditions expérimentales

Animaux d'expérience

Le rat, le lapin ou le cochon d'Inde adultes peuvent être utilisés; d'autres espèces aussi, mais il faut alors en justifier l'emploi. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux ne dépassera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si une étude dermique subchronique constitue la phase préparatoire d'une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

20 animaux au moins (10 femelles et 10 mâles) à la peau saine seront utilisés pour chaque niveau de dose. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter à ce nombre celui des animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être traité avec la dose la plus élevée pendant 90 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 28 jours qui suivent le traitement.

Doses

On utilisera au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule. La période d'exposition sera d'au moins six heures par jour. La substance à tester sera appliquée chaque jour à la même heure et sa quantité fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire ou bi-hebdomadaire afin de conserver une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal. À l'exception de l'application de la substance à tester, les animaux du lot témoin seront traités de la même façon que les sujets des lots traités. Si un véhicule est utilisé pour faciliter l'application, il sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions que pour les lots traités et la dose reçue correspondra à celle du lot traité par la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit être déterminée de manière à produire des effets toxiques mais pas, ou rarement, la mort de l'animal; la dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Si l'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la dose la plus faible dépassera cette valeur. L'idéal serait que la dose intermédiaire produise l'effet toxique minimal observable. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, l'écart entre les doses sera calculé de manière à entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots correspondant aux doses faible et intermédiaire ainsi que chez les témoins, le nombre de décès sera faible, afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Si l'application de la substance à tester provoque une grave irritation cutanée, les concentrations seront réduites; ceci peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. Si les lésions cutanées sont très graves, il peut s'avérer nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

Essai de limite

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg ou avec une dose plus élevée en fonction de la possibilité d'une exposition humaine — pour autant que celle-ci soit connue — n'a provoqué aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

Période d'observation

Les animaux d'expérience feront l'objet d'observations quotidiennes afin de détecter les manifestations de toxicité. Le moment de la mort ainsi que le moment auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront notés.

Mode opératoire

Les animaux seront placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7 pendant une période de 90 jours.

Les animaux de tous les groupes satellites devant faire l'objet d'observations complémentaires seront gardés en vie pendant 28 jours encore, sans traitement, afin de constater la guérison ou la persistance des effets toxiques. La durée d'exposition sera de 6 heures par jour.

La substance d'essai sera appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10% de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être moins importante mais la couche doit être aussi mince et aussi uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'un carré de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée sera, en outre, convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer ladite substance. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer tout résidu de substance avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux seront observés quotidiennement et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront enregistrés. Pendant la période d'encagement, on observera notamment les modifications du poil et de la peau, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. La consommation alimentaire et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin d'éviter toute perte par cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots traités non satellites seront autopsiés. Les animaux moribonds seront immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens ci-après sont habituellement effectués pour tous les animaux, y compris ceux du lot témoin:

- a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant d'administrer la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence pour tous les animaux mais au moins pour le lot traité par la dose la plus élevée ainsi que pour le lot témoin. Si des modifications oculaires sont observées tous les animaux seront examinés.

- b) Un examen hématologique comprenant l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation par des épreuves telles que temps de coagulation, temps de Quick, temps de thromboplastine ou numération des plaquettes sanguines sera effectué au terme de l'expérience.
- c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées à l'issue de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions hépatique et rénale présentent un intérêt général pour toutes les études. Le choix d'épreuves spécifiques sera influencé par les observations relatives au mode d'action de la substance. Il est suggéré de doser les substances suivantes: le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose à jeun (la période de jeûne étant adaptée à l'espèce), les transaminases glutamo-pyruvique ⁽¹⁾ et glutamo-oxaloacétique sériques ⁽²⁾, l'ornithine-décarboxylase, la gamma-glutamyl transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine plasmatique, la bilirubine totale et les protéines sériques totales. Les autres analyses éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique. D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.
- d) Un examen régulier des urines n'est pas nécessaire; un tel examen n'est indiqué qu'en cas de toxicité probable ou manifeste.

Si les informations recueillies dans le passé ne sont pas appropriées, les paramètres hématologiques et biochimiques cliniques seront déterminés avant le commencement de l'expérience.

Autopsie

Tous les animaux seront soumis à une autopsie complète comprenant l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices, ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules seront pesés, à l'état humide, le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié dans l'éventualité d'examen histopathologiques ultérieurs: toute lésion macroscopique, encéphale — y compris section de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, (trachée), poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, organes génitaux annexes, vésicule biliaire (si présente), œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie urinaire, ganglion lymphatique représentatif, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, (yeux), (sternum avec moelle osseuse), (fémur — y compris surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiathoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne seront examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

Examen histopathologique

- a) La peau normale et la peau traitée ainsi que les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et du lot exposé à la dose la plus élevée doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.
- c) Les organes-cibles des animaux appartenant aux autres lots traités seront examinés.
- d) Si l'on utilise des rats, les poumons des animaux appartenant aux lots exposés aux doses faible et intermédiaire seront soumis à un examen histopathologique afin de déceler tout signe d'infection qui permette de juger facilement de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques systématiques peuvent ne pas être nécessaires pour les animaux de ces lots mais doivent toujours être effectués pour les organes présentant des lésions dans le groupe traité par la dose la plus élevée.
- e) Lorsqu'un lot satellite est utilisé, un examen histopathologique sera pratiqué sur les tissus et organes présentant des signes de toxicité dans les lots traités.

2. RÉSULTATS

Les résultats seront résumés sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de lésions, le type de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.
⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

3. **RAPPORT**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales,
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- dose dépourvue d'effet, si possible,
- réponse toxique par sexe et par dose,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie au terme de l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout symptôme et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- observations ophtalmologiques,
- examens hématologiques pratiqués et résultats,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats (y compris, résultats de l'examen des urines),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 29
TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION

EXPÉRIENCE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés quotidiennement, pendant une période déterminée, à différentes concentrations de la substance d'essai, à raison d'une concentration par lot, pendant une période de 90 jours. Lorsqu'on utilise un véhicule en vue d'obtenir une concentration appropriée de la substance à tester dans l'atmosphère, il y a lieu de prévoir un lot témoin pour le véhicule. Durant la période d'exposition, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience de même que ceux encore en vie au terme de celle-ci sont autopsiés.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard entre le nombre de groupes requis. Au besoin, un véhicule approprié peut être ajouté à la substance à tester en vue d'obtenir une concentration appropriée de celle-ci dans l'atmosphère; si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter l'administration, ils seront réputés non toxiques. Des données publiées peuvent être utilisées le cas échéant.

Conditions d'essai

Animaux d'expérience

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser de jeunes animaux sains d'une souche de laboratoire courante. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux utilisés n'excédera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne correspondante. Si une étude subchronique par inhalation sert de phase préparatoire à une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

20 animaux au moins (10 femelles et 10 mâles) seront utilisés pour chaque groupe d'expérience. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il faudra augmenter les effectifs en fonction du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être exposé au niveau de concentration le plus élevé pendant 90 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques pendant les 28 jours qui suivent le traitement.

Concentration d'exposition

Il faut prévoir au moins trois concentrations ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule (correspondant à la concentration du véhicule au niveau d'exposition le plus élevé). À l'exception de l'inhalation de la substance d'essai, les animaux du lot témoin seront traités de la même manière que les sujets du groupe d'expérience. On attend de la concentration la plus élevée qu'elle produise des effets toxiques mais pas ou peu de décès; de la concentration la plus faible, qu'elle ne donne aucun effet toxique. Lorsqu'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la concentration la plus faible sera supérieure à cette valeur. L'idéal serait que la concentration intermédiaire produise l'effet toxique minimal observable. Si plusieurs concentrations intermédiaires sont utilisées, l'écart entre les niveaux d'exposition sera calculé de manière à entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les groupes à concentrations faible et intermédiaire ainsi que dans les groupes témoins, le nombre de morts sera faible afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Temps d'exposition

L'exposition quotidienne sera de 6 heures après obtention des concentrations dans la chambre d'exposition. D'autres périodes peuvent être utilisées pour répondre à certaines exigences spécifiques.

Équipement

Les animaux seront exposés à la substance à tester au moyen d'un dispositif d'inhalation conçu pour maintenir un flux d'air continu assurant au moins 12 renouvellements de l'air par heure, et garantir une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Si l'on utilise une chambre, celle-ci sera conçue de manière à obtenir un entassement minimal des animaux d'expérience et une exposition maximale à la substance à tester. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de la chambre, le «volume» total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai. On peut aussi avoir recours à un système d'exposition oro-nasal, de la tête seule ou du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition permettent de réduire la pénétration par d'autres voies.

Périodes d'observation

Les animaux d'expérience seront observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité tout au long de la période de traitement et de récupération. Le moment de la mort ainsi que celui auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront notés.

Mode opératoire

Les animaux sont quotidiennement exposés à la substance à tester, à raison de 5 à 7 jours par semaine, pendant une période de 90 jours. Les animaux des groupes satellites destinés à des observations complémentaires seront gardés en vie pendant 28 jours encore, sans traitement, afin de déterminer s'il y a disparition ou persistance des effets toxiques. La température à laquelle s'effectue l'épreuve sera maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Dans les conditions optimales, l'humidité relative devrait être maintenue entre 30 et 70 % mais, dans certains cas, cela peut s'avérer impossible (par exemple, essais avec aérosols). Pendant l'exposition, les animaux ne recevront ni nourriture ni eau.

On utilisera un système d'inhalation qui fonctionne dans des conditions dynamiques comportant un dispositif approprié de contrôle analytique de la concentration. Il est recommandé de procéder à un essai préliminaire afin de déterminer les concentrations d'exposition appropriées. Le débit d'air devra assurer des concentrations homogènes dans toute la chambre d'exposition. Le système permettra d'obtenir des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible.

Il y a lieu de mesurer et de contrôler:

- a) le débit d'air (en permanence);
- b) la concentration réelle de la substance d'essai mesurée dans la zone de respiration. Durant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne variera pas de plus de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne. Cependant, dans le cas de poussières et d'aérosols, cette précision peut ne pas être possible et un écart plus grand pourra alors être accepté. Durant toute la durée de l'expérience, les concentrations journalières seront maintenues aussi constantes que possible. Lors de la mise au point du système générateur, il sera procédé à une analyse granulométrique des particules afin de déterminer la stabilité des concentrations d'aérosol. Durant l'exposition, il sera procédé à des analyses aussi fréquentes que nécessaire pour déterminer la stabilité de la répartition granulométrique;
- c) la température et l'humidité;
- d) pendant et après l'exposition, des observations ont lieu et sont systématiquement notées; des fiches individuelles sont établies pour chaque animal. Tous les animaux seront observés quotidiennement et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront notés. Pendant la période d'engagement, il convient notamment d'observer les modifications de la peau et du poil, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. La consommation alimentaire et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de

s'assurer qu'il n'y a pas de perte par cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots traités non satellites sont autopsiés. En cours d'expérience, tout animal moribond sera immédiatement retiré et autopsié.

Les examens figurant ci-après sont habituellement effectués sur tous les animaux, y compris les témoins:

- a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant l'exposition à la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence sur tous les animaux mais au moins sur le groupe traité au niveau de dose le plus élevé ainsi que sur le groupe témoin. Si des modifications oculaires sont observées, tous les animaux seront examinés.
- b) Un examen hématologique comprenant l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi que l'étude de la coagulation par des épreuves telles que temps de coagulation, temps de Quick, temps de thromboplastine ou numération des plaquettes sanguines sera effectué au terme de l'expérience.
- c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées à l'issue de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions rénale et hépatique présentent un intérêt général pour toutes les études. Le choix d'épreuves spécifiques sera influencé par les observations relatives au mode d'action de la substance. Il est suggéré de doser les substances suivantes: le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose à jeun (la période de jeûne étant adaptée à l'espèce), les transaminases glutamo-pyruvique ⁽¹⁾ et glutamo-oxaloacétique sériques ⁽²⁾, l'ornithine-décarboxylase, la gamma-glutamyl transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine plasmatique, la bilirubine totale et les protéines sériques totales. Les autres analyses éventuellement nécessaires pour une évaluation toxicologique adéquate concernent les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique. D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.
- d) Un examen systématique des urines n'est pas nécessaire; un tel examen n'est indiqué qu'en cas de toxicité probable ou manifeste.

Si les informations recueillies dans le passé ne sont pas appropriées, les paramètres hématologiques et biochimiques cliniques seront déterminés avant le commencement de l'expérience.

Autopsie

Tous les animaux seront soumis à une autopsie générale comprenant l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules seront pesés, à l'état humide, le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié dans l'éventualité d'examens histopathologiques ultérieurs: toute lésion macroscopique, poumons — ceux-ci doivent être prélevés entiers, pesés et traités au moyen d'un fixateur approprié permettant de conserver la structure pulmonaire (une perfusion avec le fixateur est considérée comme une méthode efficace), tissu du rhino-pharynx, encéphale — y compris section de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, utérus, (organes génitaux annexes), (peau), vésicule biliaire (si présente), oesophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon, rectum, vessie, ganglion lymphatique respiratoire, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, (yeux), sternum avec moelle osseuse, (fémur — y compris surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiathoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne doivent être examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

Examen histopathologique

- a) Les voies respiratoires ainsi que les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et de ceux du lot exposé au niveau le plus élevé feront l'objet d'un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les lésions marquées seront examinées.
- c) Les organes-cibles des animaux appartenant à d'autres lots traités seront examinés.
- d) Les poumons des animaux appartenant aux groupes exposés à des doses faible et intermédiaire seront également soumis à un examen histopathologique, les poumons étant un indicateur commode de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques réguliers peuvent ne pas être nécessaires pour les animaux de ces groupes mais doivent toujours être effectués pour les organes présentant des lésions dans le lot traité au niveau d'exposition le plus élevé.
- e) Lorsqu'un groupe satellite est utilisé, un examen histopathologique sera pratiqué sur les tissus et les organes présentant des signes de toxicité dans les autres lots traités.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous la forme de tableaux, indiquant pour chaque lot d'expérience le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de lésions, le type de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales:

Description de l'appareil d'exposition y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air évacué et, le cas échéant, méthode de stabulation des animaux dans la chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité et, si nécessaire, la stabilité des concentrations d'aérosol ou la granulométrie des particules sera décrit.

Données relatives à l'exposition

Ces données seront présentées sous la forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:

- a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
 - b) la température et l'humidité de l'air;
 - c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
 - d) le cas échéant, la nature du véhicule;
 - e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
 - f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),
- réponse toxique par sexe et par concentration,
 - moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
 - description des effets toxiques ou autres; niveau d'exposition dépourvu d'effet,
 - moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,
 - quantité de nourriture et poids corporel,
 - observations ophtalmologiques,
 - examens hématologiques pratiqués et résultats,
 - épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats (y compris résultats de l'examen des urines),
 - résultats d'autopsie,
 - description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
 - traitement statistique des résultats, si possible,
 - discussion des résultats,
 - interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 30

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ CHRONIQUE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée normalement sept jours sur sept, par une voie appropriée, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe, pendant une grande partie de leur vie. Pendant et après l'exposition à la substance à tester, les animaux d'expérience sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'encagement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les cinq jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard entre le nombre de lots requis.

Conditions expérimentales

Animaux d'expérience

Le rat est l'espèce la mieux appropriée.

Compte tenu des résultats d'études antérieures, d'autres espèces (rongeurs ou autres) peuvent être utilisées. De jeunes animaux sains de souches de laboratoire courantes seront utilisés et le traitement commencera dès que possible après le sevrage.

Au début de l'essai, la différence de poids entre les animaux utilisés ne dépassera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si une étude orale subchronique a servi de phase préparatoire à une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

Dans le cas de rongeurs, 40 animaux au moins (20 femelles et 20 mâles) seront utilisés pour chaque dose et chaque lot témoin correspondant. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'augmenter en conséquence les effectifs des groupes.

Pour les non-rongeurs, un plus petit nombre d'animaux au moins quatre par sexe et par groupe, peut être accepté.

Niveaux de dose et fréquence d'exposition

Trois doses au moins seront utilisées en plus des groupes témoins correspondants. La dose la plus élevée sera suffisante pour produire des manifestations nettes de toxicité sans entraîner une mortalité excessive.

La dose la plus faible ne produira aucun effet toxique.

La dose (les doses) intermédiaire(s) aura (auront) une valeur proche de la moyenne entre la dose forte et la dose faible.

Les doses seront choisies en fonction de données obtenues lors d'essais préliminaires et d'études de toxicité effectuées antérieurement.

Il est prévu une exposition quotidienne. Si le produit chimique est administré dans l'eau de boisson ou incorporé à l'alimentation, il devra être constamment disponible.

Témoins

On utilisera un groupe témoin en tout point identique au groupe exposé, exception faite toutefois de l'exposition à la substance à tester.

Dans des conditions particulières telles que des études d'inhalation impliquant l'emploi d'aérosols ou l'utilisation d'un émulsifiant à activité biologique non caractérisée dans des études par voie orale, on utilisera un groupe témoin négatif concurrent. Le groupe témoin négatif est traité de la même façon que tous les autres animaux d'expérience, exception faite de l'exposition à la substance à tester ou à un véhicule quelconque.

Voie d'administration

Les deux principales voies d'administration sont la voie orale et la voie respiratoire (inhalation). Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance à tester ainsi que du mode d'exposition probable pour l'homme.

L'utilisation de la voie dermique pose des problèmes pratiques considérables. La toxicité chronique générale due à l'absorption percutanée peut normalement être déduite des résultats de l'essai par voie orale et de la quantité de substance absorbée par voie percutanée lors des essais de toxicité par voie percutanée antérieurs.

Études par voie orale

En cas d'absorption gastro-intestinale de la substance à tester, et si l'ingestion est une voie d'exposition humaine, sauf contre-indications, on utilise de préférence la voie orale. Les animaux recevront la substance à tester dans leur nourriture, dissoute dans l'eau de boisson, ou sous la forme de capsule. Dans les conditions idéales, la dose quotidienne sera administrée 7 jours sur 7 car l'administration pendant 5 jours sur 7 peut permettre à l'animal de récupérer ou à la toxicité de décroître durant la période où le traitement est interrompu et affecter, par conséquent, les résultats et les évaluations ultérieures. Cependant, pour des raisons essentiellement pratiques, on peut accepter que la substance soit administrée 5 jours sur 7.

Études d'inhalation

Les études d'inhalation posant des problèmes techniques beaucoup plus complexes que pour les autres voies d'administration, des recommandations plus détaillées sont données ici. Il convient également de noter que l'instillation intratrachéale constitue une méthode valable dans certains cas spécifiques.

Les expositions prolongées sont habituellement établies en fonction de l'exposition humaine possible: les animaux sont soit exposés 5 jours sur 7 (exposition intermittente) à raison de 6 heures par jour après équilibrage des concentrations dans la chambre d'essai, soit soumis 7 jours sur 7 (exposition permanente) à une exposition journalière de 22 à 24 heures, une heure par jour environ étant consacrée à l'alimentation des animaux (horaire régulier) et à l'entretien de la chambre d'essai.

Dans les deux cas, les animaux sont habituellement exposés à une concentration fixe du produit à tester. Une différence essentielle entre l'exposition intermittente et l'exposition permanente réside dans le fait que, dans le premier cas, les animaux disposent d'une période de 17 à 18 heures pour se remettre des effets de l'exposition quotidienne et même d'une période plus longue durant les week-ends.

L'exposition intermittente ou permanente sera choisie en fonction des objectifs de l'étude et de l'exposition humaine que l'on se propose de simuler. Il convient, toutefois, de tenir compte de certaines difficultés techniques: par exemple, les avantages qu'offre l'exposition permanente pour simuler les conditions ambiantes peuvent être contre-balançés par la nécessité d'alimenter et de faire boire les animaux pendant l'exposition ainsi que par les contraintes inhérentes à la complexité (et fiabilité) de la génération des aérosols et des vapeurs et des moyens de contrôle.

Chambre d'exposition

Les animaux seront exposés à la substance à tester dans des chambres d'inhalation conçues pour assurer un flux d'air dans des conditions dynamiques, avec au moins 12 renouvellements de l'air par heure, garantir un teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Les chambres d'exposition et les chambres destinées aux animaux témoins seront identiques du point de vue de la construction et de la conception afin de garantir des conditions d'exposition en tout point comparable, à la seule exception de l'exposition à la substance à tester. Une pression légèrement négative est généralement maintenue à l'intérieur de la chambre afin d'empêcher les fuites de la substance à tester dans la zone environnante. Les chambres seront conçues de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de la chambre, le volume total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5% du volume de la chambre d'essai.

Mesures ou contrôles à effectuer:

- (i) le débit d'air: le débit d'air dans la chambre fera, de préférence, l'objet d'un contrôle continu;
- (ii) durant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne variera pas de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne.
Durant toute la durée de l'expérience, les concentrations journalières seront maintenues aussi constantes que possible;
- (iii) température et humidité: pour les rongeurs, la température sera maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et l'humidité à l'intérieur de la chambre sera de 30 à 70 %, sauf lorsqu'on utilise de l'eau pour mettre la substance à tester en suspension dans l'air dans la chambre d'essai. Ces deux paramètres seront, de préférence, contrôlés en permanence;
- (iv) analyse granulométrique des particules: une répartition granulométrique des particules sera effectuée pour les atmosphères de la chambre d'essai impliquant l'utilisation d'aérosols liquides ou solides. Les particules de l'aérosol seront d'une taille respirable pour l'animal d'expérience utilisé. Des échantillons des atmosphères des chambres d'essai seront prélevés dans la zone respirable par les animaux. L'échantillon d'air prélevé sera représentatif de la répartition des particules auxquelles les animaux sont exposés et représentera, sur une base gravimétrique, la totalité de l'aérosol en suspension, même si une grande partie de celui-ci n'est pas respirable. Les analyses granulométriques seront effectuées fréquemment durant la mise au point du système générateur afin de veiller à la stabilité de l'aérosol puis, par la suite, uniquement lorsqu'il sera nécessaire de déterminer de façon adéquate la stabilité de la répartition des particules auxquelles les animaux ont été exposés.

Durée de l'étude

La durée du traitement sera d'au moins 12 mois.

Mode opératoire

Observations

Il sera procédé au moins une fois par jour à un examen clinique attentif. Des observations complémentaires seront faites quotidiennement et des mesures appropriées seront prises afin de réduire la perte d'animaux pour l'étude, par exemple autopsie ou cryobiologie pour les animaux trouvés morts ainsi qu'isolement ou sacrifice des animaux en mauvaise santé. Les animaux seront soigneusement observés afin de déceler l'apparition et l'évolution de toutes les manifestations de toxicité ainsi que pour réduire la perte d'animaux pour cause de maladie, d'autolyse ou de cannibalisme.

Les signes cliniques, y compris les modifications neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité seront relevés pour tous les animaux. Le moment de l'apparition des effets toxiques et leur évolution ainsi que les tumeurs suspectes seront notés.

Le poids de chaque animal sera déterminé et noté une fois par semaine durant les 13 premières semaines de la période d'essai, puis au moins une fois toutes les 4 semaines. La consommation alimentaire sera déterminée chaque semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis tous les 3 mois environ, à moins que l'état de santé ou les modifications de poids corporel nécessitent une autre fréquence.

Examen hématologique

Un examen hématologique (par exemple, teneur en hémoglobine, hémocrite, numération des érythrocytes, des leucocytes, des thrombocytes ou étude de la coagulation) sera effectué au troisième et au sixième mois, puis tous les 6 mois environ ainsi qu'au terme de l'essai, sur des échantillons de sang prélevés chez tous les non-rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de tous les groupes. Ces échantillons seront, si possible, prélevés chaque fois sur les mêmes rats. De plus, un échantillon sera prélevé chez tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs avant de commencer l'essai.

Si les observations cliniques indiquent une détérioration de l'état de santé des animaux durant l'étude, il sera procédé à une numération avec formule leucocytaire chez les animaux atteints.

La formule leucocytaire est établie sur les échantillons des animaux traités par la dose la plus élevée ainsi que sur ceux des animaux du groupe témoin. Cette formule n'est établie pour les groupes exposés à des doses plus faibles que si l'on constate un écart important entre le groupe exposé à la dose la plus élevée et le groupe témoin, ou si l'examen pathologique le justifie.

Examen des urines

Des échantillons d'urine seront collectés pour analyse chez tous les non-rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de chaque groupe, si possible chez les mêmes rats et aux mêmes moments que pour l'examen hématologique. Qu'il s'agisse de non-rongeurs ou des rongeurs, il sera procédé aux déterminations suivantes:

- apparence; volume et densité pour chaque animal,

- protéines, glucose, cétones, signes discrets d'hémorragie (semi-quantitativement)
- et
- microscopie des sédiments urinaires (semi-quantitativement).

Chimie clinique

Tous les six mois environ ainsi qu'au terme de l'essai, des échantillons de sang sont prélevés, afin d'effectuer des déterminations chimiques cliniques, chez tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de chaque groupe, en prenant si possible chaque fois les mêmes rats. De plus, un échantillon sera prélevé sur tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs avant de commencer l'essai. Le plasma est préparé à partir de ces échantillons et l'on procède aux déterminations suivantes:

- concentrations des protéines totales,
- concentration de l'albumine,
- analyse de la fonction hépatique [telle que activité phosphatase alcaline, activité SGOT ⁽¹⁾ et activité SGPT ⁽²⁾], gamma-glutamyl transpeptidase, ornithine-décarboxylase,
- métabolisme glucidique tel que glycémie à jeun,
- exploration fonctionnelle rénale telle qu'azote uréique du sang.

Autopsie

Un examen complet sera effectué sur tous les animaux, y compris ceux qui sont morts en cours d'expérience ou qui ont été sacrifiés à l'état moribond. Avant de sacrifier les animaux, des échantillons de sang seront prélevés afin d'établir la formule leucocytaire. Tous les organes ou tissus présentant des lésions macroscopiques visibles, des tumeurs ou des lésions soupçonnées d'être des tumeurs seront conservés. On tentera de mettre en corrélation les observations macroscopiques et microscopiques.

Tous les organes et tissus seront conservés en vue d'un examen au microscope. Il s'agit habituellement des organes et tissus ci-après: encéphale ⁽³⁾ (moelle/pont de Varole, cortex cérébelleux, cortex cérébral), hypophyse, thyroïde (y compris parathyroïdes), thymus, poumons (y compris trachée), cœur, aorte, glandes salivaires, foie ⁽³⁾, rate, reins ⁽³⁾, glandes surrénales ⁽³⁾, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, utérus, vessie urinaire, ganglions lymphatiques, pancréas, gonades ⁽³⁾, organes génitaux annexes, femelle: glande mammaire, peau, musculature, nerf périphérique, moelle épinière (cervicale, thoracique, lombaire), sternum avec moelle osseuse et fémur (y compris articulation), yeux. Bien que l'inflation des poumons et de la vessie urinaire au moyen d'un fixateur constitue la meilleure manière de conserver ces tissus, l'inflation des poumons est essentielle dans les études d'inhalation si l'on veut effectuer les examens histopathologiques appropriés. Dans des études particulières telles que des études d'inhalation, tout le tractus respiratoire sera étudié y compris le nez, le pharynx et le larynx.

Si d'autres examens cliniques sont effectués, les informations obtenues seront communiquées avant de commencer les examens au microscope car elles peuvent fournir des indications précieuses au pathologiste.

Examen histopathologique

Toutes les modifications visibles, en particulier les tumeurs et autres lésions, observées sur un organe feront l'objet d'un examen au microscope. De plus, il est recommandée d'effectuer les examens suivants:

- a) Examen au microscope de tous les organes et tissus conservés et description complète de toutes les lésions observées
 - 1) sur tous les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude
 - et
 - 2) sur tous les animaux du(des) groupe(s) exposé(s) à la dose la plus élevée et sur tous les témoins.
- b) Les organes ou tissus présentant des anomalies spontanées ou éventuellement induites par la substance à tester seront également examinés dans les groupes exposés aux doses plus faibles.
- c) Si l'expérience met en évidence une altération substantielle de la longévité normale des animaux ou l'induction d'effets susceptibles d'affecter la réponse toxique, les animaux exposés à la dose immédiatement inférieure seront soumis à l'examen mentionné ci-dessus.
- d) L'incidence des lésions atteignant normalement la souche d'animaux utilisée (dans les mêmes conditions d'expérience, c'est-à-dire références antérieures) est indispensable pour évaluer correctement la signification des modifications observées sur les animaux exposés.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

⁽³⁾ Ces organes prélevés sur 10 animaux par sexe et par groupe dans le cas des rongeurs et sur tous les non-rongeurs seront pesés de même que la thyroïde (et la parathyroïde) chez tous les non-rongeurs.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales:
 - description de l'appareil d'exposition:
y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air évacué et, le cas échéant, mode de stabulation des animaux en chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température et, si nécessaire, l'humidité, la stabilité de la concentration d'aérosol ou la granulométrie, seront décrits;
 - données relatives à l'exposition:
elles seront présentées sous forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:
 - a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
 - b) la température et l'humidité de l'air;
 - c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
 - d) le cas échéant, la nature du véhicule;
 - e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
 - f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- réponse toxique par sexe et dose,
- dose ou concentration dépourvues d'effet,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- observations ophtalmologiques,
- épreuves hématologiques pratiquées et résultats complets,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets (y compris résultats de l'examen des urines),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 31
ÉTUDE DE TÉRATOGENICITÉ

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principes de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée, à différentes doses ou concentrations, au moins pendant la partie de la gestation couvrant l'organogénèse, à plusieurs lots d'animaux d'expérience gravides, à raison d'une dose par lot. Peu de temps avant la date présumée de la parturition, la mère est sacrifiée, l'utérus prélevé et son contenu examiné. Cette méthode d'essai explore l'embryotoxicité et la toxicité fœtale.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

De jeunes femelles adultes et saines, n'ayant jamais été accouplées, d'âge et de taille homogènes, sont acclimatées aux conditions expérimentales pendant 5 jours au moins avant l'expérience. Les femelles sont accouplées avec des mâles dont la fécondité est établie, puis sont réparties au hasard entre les groupes traités. La fécondation peut s'effectuer soit naturellement soit par insémination artificielle.

La substance à tester est administrée quotidiennement aux femelles immédiatement après l'implantation et pendant toute la période d'organogénèse. Un jour avant le terme, les fœtus sont prélevés par hystérectomie et on examine les anomalies des viscères ou du squelette, y compris retard de croissance, ossification tardive et hémorragies intestinales.

Conditions expérimentales

Animaux d'expérience

Les espèces habituellement utilisées sont le rat, la souris, le hamster et le lapin, avec une préférence pour le rat et le lapin. Des souches de laboratoire courantes seront utilisées. La souche utilisée aura une fécondité suffisante et sera caractérisée par sa réaction aux agents tératogènes. Les animaux seront placés dans des cages individuelles.

Nombre et sexe

Au moins vingt rats, souris ou hamsters gravides ou douze lapines gravides sont nécessaires pour chaque dose. L'objectif est d'obtenir un nombre de portées et de petits suffisant pour évaluer le potentiel tératogène de la substance.

Doses

Trois doses au moins ainsi qu'un lot témoin seront utilisés. Si la substance à tester est administrée dans un véhicule, on utilisera également un lot témoin pour le véhicule. Les propriétés toxicologiques du véhicule doivent être connues; il ne doit avoir aucun effet tératogène ou autre sur la reproduction. À l'exception de la substance à tester, les animaux du (des) groupe(s) témoin(s) seront traités de la même manière que les sujets des groupes d'expérience.

À moins que la nature physique/chimique ou les propriétés biologiques de la substance ne s'y opposent, la dose la plus élevée mettra en évidence, dans les conditions idéales, une certaine toxicité chez la mère, par exemple une légère diminution du poids, mais n'entraînera pas la mort de plus de 10 % des mères. La dose la plus faible ne produira pas d'effets observables imputables à la substance à tester. La (les) dose(s) intermédiaire(s) se situera (situeront) géométriquement entre les doses fortes et faibles.

Essai de limite

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si une dose d'au moins 1 000 mg/kg ne produit aucun effet toxique sur l'embryon ou aucun effet tératogène, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience avec d'autres doses. Si une dose de moins de 1 000 mg/kg met en évidence une certaine toxicité chez la mère (comme précisé ci-dessus) mais n'a aucun effet nocif sur l'embryon, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience avec d'autres doses.

Temps d'exposition

Lors de l'essai, le jour 0 est celui où l'on observe la présence d'un bouchon vaginal/ou de sperme (lorsque c'est possible). Le traitement couvrira la période de l'organogénèse, à savoir jours 6 – 15 pour le rat et la souris, jours 6 – 14 pour le hamster et 6 – 18 pour le lapin. Si le jour 0 est celui de l'accouplement ou de l'insémination artificielle, on ajoutera un jour à chacune des périodes mentionnées. La période de traitement peut aussi être prolongée jusqu'à environ un jour avant la date présumée de parturition.

Période d'observation

Un examen clinique attentif sera effectué au moins une fois par jour. Des examens complémentaires seront effectués quotidiennement et des mesures appropriées seront prises afin de réduire la perte d'animaux pour l'étude.

Mode opératoire

La substance à tester est administrée oralement par gavage. Elle sera administrée à peu près à la même heure tous les jours, pendant toute la durée du traitement.

La dose peut être calculée en fonction du poids des femelles au début du traitement ou, compte tenu du gain de poids rapide durant la gestation, elles peuvent être pesées périodiquement et la dose adaptée à leur poids le plus récent. Les signes de toxicité seront notés ainsi au fur et à mesure de leur apparition, avec indication de leur intensité et de leur durée. Les femelles présentant des signes d'avortement ou de parturition avant terme seront sacrifiées et soumises à un examen macroscopique complet. La période d'observation après traitement se poursuivra jusqu'à environ un jour avant le terme. Le but est de couvrir la plus grande partie de la période de gestation mais d'éviter les difficultés que pourrait présenter l'interprétation des résultats s'il y avait naissance naturelle. Pendant la période d'encagement, on observera notamment les modifications du poil et de la peau, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. La consommation alimentaire ainsi que le poids des animaux seront déterminés chaque semaine.

Autopsie

Au moment de la mort, en cours d'étude ou à l'issue de celle-ci, les sujets feront l'objet d'un examen macroscopique afin de rechercher toute anomalie structurale ou toute modification pathologique susceptibles d'avoir influencé la gestation. Immédiatement après la mort, l'utérus sera prélevé et son contenu examiné afin de relever le nombre d'embryons ou de fœtus morts ainsi que le nombre de fœtus vivants. Il est habituellement possible de déterminer le moment de la mort *in utero*. Le nombre de corps jaunes peut être déterminé chez les rats et les lapins. Le sexe et le poids de chaque fœtus seront déterminés; les poids seront notés et le poids moyen calculé. Après prélèvement, chaque fœtus fera l'objet d'un examen externe. Dans le cas des rats, des souris et des hamsters, 30 à 50 % des animaux de chaque portée seront préparés et examinés du point de vue des anomalies du squelette, les autres seront préparés et examinés afin de rechercher les anomalies des tissus mous par des méthodes appropriées. Dans le cas des lapins, chaque fœtus sera soigneusement disséqué afin de rechercher les anomalies des viscères, puis examiné du point de vue des anomalies du squelette.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux gravides, le nombre et le pourcentage des fœtus vivants et de fœtus présentant des anomalies des tissus mous ou du squelette ainsi que leur lien avec des portées spécifiques. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RAPPORT**

3.1. **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales,
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- réponse toxique par dose,
- dose dépourvue d'effet (si possible),
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- durée de la gestation et information sur la portée (y compris données publiées),
- données relatives aux foetus (vivant/mort, sexe, anomalie des tissus mous et du squelette),
- données sur la portée (vivant/mort, sexe, anomalie des tissus mous et du squelette pour chaque portée),
- traitement statistique des résultats,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 32
ÉTUDE DE CANCÉROGÈNESE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée normalement 7 jours sur 7, par une voie appropriée, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe, pendant la majeure partie de leur vie. Durant l'exposition à la substance à tester et après celle-ci, les animaux d'expérience sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité, en particulier la formation de tumeurs.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales d'encagement et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude. Avant de commencer l'étude, les animaux jeunes et en bonne santé sont randomisés et répartis entre le nombre de groupes requis.

Animaux d'expérience

L'espèce préférée est le rat.

Compte tenu des résultats d'études antérieures, d'autres espèces (rongeurs ou autres) peuvent être utilisées. De jeunes animaux sains de souches courantes de laboratoire doivent être utilisés et le traitement doit commencer dès que possible après sevrage.

Au début de l'étude, la différence de poids entre les animaux utilisés ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si un essai de toxicité subchronique par voie orale a été réalisé antérieurement à l'essai à long terme, la même espèce, race/souche doit être utilisée pour les deux essais.

Nombre et sexe

S'agissant de rongeurs, au moins 100 animaux (50 femelles et 50 mâles) doivent être utilisés pour chaque niveau de dose et chaque groupe témoin correspondant. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on prévoit des sacrifices d'animaux en cours d'expérience, les effectifs doivent être augmentés en conséquence du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience.

Doses et fréquence d'exposition

Outre les groupes témoins correspondants, trois niveaux de dose au moins devraient être utilisés. La dose supérieure devrait être suffisamment élevée pour montrer un effet de toxicité minimale tel qu'un faible ralentissement de la croissance du poids corporel (moins de 10%), sans altération notable de la durée de vie normale due à des effets autres que les tumeurs.

La dose la plus faible n'aura aucun effet sur la croissance, le développement et la longévité normale de l'animal et ne produira aucun effet toxique quelconque. En général, cette dose ne sera pas inférieure à 10% de la dose élevée.

La dose (les doses) intermédiaire(s) aura (auront) une valeur proche de la moyenne entre la dose forte et la dose faible.

Les niveaux de dose prendront en compte les données fournies par les essais et les études de toxicité effectués antérieurement.

L'exposition est de façon générale quotidienne.

Si le produit chimique est administré dans l'eau de boisson ou incorporé à la nourriture, il devra être constamment disponible.

Témoins

Les groupes témoins devront être en tout point identiques aux groupes traités, exception faite de l'exposition à la substance à tester.

Dans des conditions particulières, comme au cours des études par inhalation impliquant l'emploi d'aérosols ou l'utilisation d'un émulsifiant à activité biologique non étudiée au cours d'études par voie orale, on utilisera un groupe témoin supplémentaire non exposé au véhicule.

Voie d'administration

Les trois principales voies d'administration sont la voie orale, la voie cutanée (percutanée) et la voie respiratoire (inhalation). Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance à tester ainsi que de la voie probable d'exposition humaine.

Études par voie orale:

La voie orale d'administration est préférée, sauf contre-indications, si la substance est absorbée par voie gastro-intestinale, et si l'ingestion est une voie d'exposition humaine. Les animaux devront recevoir la substance à tester dans leur nourriture, dissoute dans l'eau de boisson ou sous la forme de capsule.

Dans les conditions idéales, la dose quotidienne sera administrée 7 jours sur 7 car l'administration 5 jours sur 7 peut permettre à l'animal de récupérer ou à la toxicité de décroître durant la période où le traitement est interrompu et affecter, par conséquent, les résultats et l'évaluation ultérieure. Cependant, pour des raisons essentiellement pratiques, on peut accepter que la substance soit administrée 5 jours sur 7.

Études par voie cutanée:

L'exposition cutanée par badigeonnage de la peau peut être retenue pour simuler une voie d'exposition importante pour l'homme et comme une façon d'induire des lésions cutanées.

Études d'inhalation:

Les études d'inhalation posant des problèmes techniques beaucoup plus complexes que les autres voies d'administration, des recommandations plus détaillées sont données ici. Il convient également de noter que l'instillation intratrachéale peut constituer une méthode valable dans certains cas spécifiques.

Les expositions prolongées sont habituellement établies en fonction de l'exposition humaine possible: les animaux sont soit exposés 5 jours sur 7 (exposition intermittente) à raison de 6 heures par jour après équilibrage des concentrations dans la cage d'expérimentation soit, si une exposition environnementale est possible chez l'homme, exposés 7 jours sur 7 (exposition continue) à raison de 22 à 24 heures par jour, une heure par jour environ étant consacrée à l'alimentation des animaux, selon un horaire régulier, et à l'entretien des cages d'expérimentation. Dans les deux cas, les animaux sont habituellement exposés à une concentration fixe de produits à tester. Une différence essentielle entre l'exposition intermittente et l'exposition continue réside dans le fait que dans le premier cas les animaux disposent d'une période de 17 à 18 heures pour récupérer des effets de l'exposition quotidienne et même d'une période plus longue durant les week-ends.

L'exposition intermittente ou permanente sera choisie en fonction des objectifs de l'étude et de l'exposition de l'être humain qui doit être simulée. Il convient toutefois de tenir compte de certaines difficultés techniques: par exemple, les avantages qu'offre l'exposition continue pour simuler les conditions ambiantes peuvent être contrebalancés par la nécessité d'alimenter et de faire boire les animaux durant l'exposition ainsi que par les contraintes inhérentes à la complexité (et fiabilité) de la génération des aérosols ou des vapeurs et des moyens de contrôle.

Enceintes d'exposition

Les animaux seront exposés à la substance à tester dans des cages d'inhalation conçues pour assurer un flux d'air dynamique d'au moins 12 renouvellements de l'air par heure, une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Les enceintes d'exposition et les enceintes témoins seront identiques du point de vue de la construction et de la conception afin de garantir des conditions d'exposition en tous points comparables, exception faite de l'exposition aux substances à tester. Une pression légèrement négative est

généralement maintenue à l'intérieur de la chambre afin d'empêcher les fuites de la substance à tester dans la zone environnante. Les enceintes seront conçues de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de l'enceinte, le volume total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de l'enceinte d'exposition.

Mesures et contrôles à effectuer:

- (i) le débit d'air: le débit d'air dans la chambre fera, de préférence, l'objet d'un contrôle continu;
- (ii) concentration: durant la période d'exposition quotidienne, la concentration de la substance à tester ne variera pas de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne. Durant toute la durée de l'étude, les concentrations quotidiennes seront maintenues aussi constantes que possible;
- (iii) température et humidité: pour les rongeurs, la température sera maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et l'humidité à l'intérieur de l'enceinte sera de 30 à 70 %, sauf lorsqu'on utilise de l'eau pour mettre la substance à tester en suspension dans l'air de la cage d'exposition. Ces deux paramètres seront, de préférence, contrôlés en permanence;
- (iv) analyse granulométrique des particules: une répartition granulométrique des particules sera effectuée pour les atmosphères des chambres où des aérosols liquides ou solides sont utilisés. Les particules de l'aérosol seront d'une taille inhalable pour l'animal d'expérience utilisé. Des échantillons de l'air des cages d'exposition seront prélevés à la hauteur des voies respiratoires des animaux. L'échantillon d'air prélevé sera représentatif de la répartition des particules auxquelles les animaux sont exposés et représentera, sur une base gravimétrique, l'ensemble de l'aérosol en suspension, même si une grande partie de celui-ci n'est pas inhalable. Les analyses granulométriques seront effectuées fréquemment durant la mise au point du système de génération afin de veiller à la stabilité de l'aérosol, et ensuite aussi souvent que nécessaire pendant les expositions pour déterminer de façon adéquate la stabilité de la répartition des particules auxquelles les animaux ont été exposés.

Durée de l'étude

Un essai de cancérogénicité couvre la majeure partie de la durée de vie normale des animaux d'expérience: 18 mois pour la souris et le hamster et 24 mois pour le rat; cependant pour certaines souches d'animaux ayant une plus grande longévité et/ou un faible taux de tumeur spontanée, l'essai sera de 24 mois pour la souris et le hamster et de 30 mois pour le rat. Il peut également être mis fin à une telle étude lorsque le nombre de survivants dans le groupe exposé à la dose la plus faible ou dans le groupe témoin atteint 25 %. S'il y a manifestement une réponse différente par sexe, chaque sexe sera considéré comme faisant l'objet d'une étude distincte. Lorsque seuls les sujets du groupe exposé à la dose élevée meurent prématurément pour des raisons de toxicité évidentes, il n'est pas nécessaire de mettre fin à l'essai à condition que les manifestations toxiques ne posent pas de problèmes dans les autres groupes. Pour qu'un résultat d'essai négatif soit acceptable, il faut que, par lot, il n'y ait pas plus de 10 % d'animaux perdus pour l'étude en raison d'autolyse, de cannibalisme ou de problèmes organisationnels et que le taux de survie dans tous les lots ne soit pas inférieur à 50 % après 18 mois en ce qui concerne la souris et le hamster et après 24 mois en ce qui concerne le rat.

Mode opératoire

Observations

Les observations quotidiennes sur les animaux en cage porteront notamment sur les modifications de la peau et du poil, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice ainsi que du comportement.

Il convient de surveiller régulièrement les animaux afin d'éviter, autant que possible, toute perte pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur d'encagement. Les animaux moribonds seront immédiatement mis à part et autopsiés.

Les signes cliniques ainsi que la mortalité seront notés pour tous les animaux. On attachera une attention spéciale à la formation de tumeur; le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'apparence et l'évolution de toute tumeur nettement visible ou palpable seront notées.

La consommation alimentaire (ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) sera déterminée chaque semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis tous les trois mois environ, à moins que l'état de santé ou les modifications de poids corporel nécessitent une autre fréquence.

Les poids corporels seront relevés individuellement pour tous les animaux une fois par semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis une fois toutes les 4 semaines au moins.

Examen clinique

Hématologie

Si les observations effectuées pendant la période d'engagement indiquent une détérioration de l'état de santé de certains animaux au cours de l'étude, on établira la formule sanguine des animaux affectés.

Un frottis sanguin est effectué pour tous les animaux au douzième et au dix-huitième mois ainsi qu'avant de les sacrifier. La formule sanguine est établie à partir des échantillons prélevés sur les témoins ainsi que sur les animaux du groupe exposé à la dose la plus élevée. Si ces données, en particulier celles obtenues avant de sacrifier les animaux, ou les données provenant de l'examen histopathologique en font apparaître le besoin, les formules sanguines sont également établies pour les animaux appartenant aux groupes exposés aux doses immédiatement inférieures.

Autopsie

Une autopsie complète sera effectuée pour tous les animaux, y compris ceux morts en cours d'expérience ou sacrifiés à l'état moribond. Tous les organes ou tissus présentant des tumeurs ou des lésions nettement visibles ou des lésions soupçonnées d'être des tumeurs seront conservés.

Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié permettant d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs: l'encéphale (y compris sections de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral), hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée et poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, utérus, organes génitaux annexes, peau, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie, ganglions lymphatiques représentatifs, glande mammaire femelle, musculature de la cuisse, nerf périphérique, sternum avec moelle osseuse, fémur (y compris les articulations), moelle épinière à trois niveaux (cervical, médiathoracique et lombaire), yeux.

L'insufflation d'un fixateur dans les poumons et la vessie constitue la meilleure façon de conserver ces tissus; l'insufflation des poumons est absolument nécessaire dans les études d'inhalation si l'on veut procéder à des examens histopathologiques appropriés. Dans les études par inhalation, tout le tractus respiratoire sera conservé, y compris la cavité nasale, le pharynx et le larynx.

Examen histopathologique

- a) Les organes et tissus de tous les animaux morts ou sacrifiés en cours d'expérience ainsi que de tous les animaux du groupe témoin et du groupe exposé à la dose élevée seront soumis à un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les tumeurs nettement visibles ou les lésions soupçonnées d'être des tumeurs dans tous les groupes feront l'objet d'un examen microscopique.
- c) Si l'on observe une différence significative dans l'incidence des lésions néoplasiques entre le groupe exposé à la dose la plus élevée et le groupe témoin, un examen histopathologique sera effectué pour l'organe ou le tissu concerné dans les autres groupes.
- d) Si le taux de survie dans le groupe exposé à la dose élevée est nettement inférieur à celui observé pour le groupe témoin, les animaux du groupe exposé à la dose immédiatement inférieure seront soumis à un examen complet.
- e) Si, dans le groupe exposé à la dose élevée, on observe une induction d'effets toxiques ou autres susceptibles d'affecter la réponse néoplasique, les animaux exposés à la dose immédiatement inférieure feront l'objet d'un examen complet.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de tumeurs décelées en cours d'expérience, le moment où celles-ci sont décelées et le nombre d'animaux sur lesquels des tumeurs sont observées à l'autopsie. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique validée peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— espèces souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,

— conditions d'essai:

description du système d'exposition:

y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air expiré et, le cas échéant, mode de stabulation des animaux en chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité et, si nécessaire, la stabilité des concentrations d'aérosol ou la granulométrie seront décrits;

données relatives à l'exposition:

elles seront présentées sous forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:

- a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
- b) la température et l'humidité de l'air;
- c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
- d) le cas échéant, la nature du véhicule;
- e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
- f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),

— niveaux de dose (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,

— incidence des tumeurs par sexe, dose et type de tumeur,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,

— réponse toxique par sexe et dose,

— description des effets toxiques ou autres,

— le moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,

— consommation alimentaire et poids corporel,

— résultats de l'examen hématologique,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques,

— traitement statistique des résultats et description des méthodes utilisées,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 33

ÉTUDE COMBINÉE DE CANCÉROGÈNE ET DE TOXICITÉ CHRONIQUE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Le but d'une étude combinée de la toxicité chronique et de la cancérogénèse est de déterminer les effets chroniques et cancérogènes d'une substance sur une espèce mammifère à l'issue d'une exposition prolongée (à long terme).

C'est pourquoi une étude de cancérogénèse est complétée par au moins un groupe satellite traité et un groupe satellite témoin. La dose utilisée pour le groupe satellite soumis à la dose élevée peut être supérieure à celle utilisée pour le groupe soumis à la dose élevée dans l'étude de cancérogénèse. Dans cette dernière étude, les animaux sont examinés du point de vue de la toxicité générale ainsi que de la réponse cancérogène. Les animaux du groupe satellite traité sont examinés du point de vue de la toxicité générale.

La substance à tester est normalement administrée 7 jours sur 7 par une voie appropriée, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe, pendant la majeure partie de leur vie. Au cours et après l'exposition à la substance, les animaux d'expérience sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité et le développement de tumeurs.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode

Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont randomisés et répartis entre les groupes requis (traités et témoins).

Animaux d'expérience

L'espèce préférée est le rat. Compte tenu des résultats d'études antérieures, d'autres espèces (rongeurs ou autres) peuvent être utilisées. De jeunes animaux sains de souches courantes de laboratoire doivent être utilisés et le traitement doit commencer dès que possible après sevrage.

Au début de l'étude, la différence de poids entre les animaux utilisés ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si un essai de toxicité subchronique par voie orale a été réalisé à titre préliminaire à l'essai à long terme, la même espèce, race/souche doit être utilisée pour les deux essais.

Nombre et sexe

S'agissant de rongeurs, au moins 100 animaux (50 femelles et 50 mâles) seront utilisés pour chaque niveau de dose et chaque groupe témoin correspondant. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit des sacrifices d'animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'augmenter les effectifs en conséquence.

Le(s) groupe(s) satellite(s) traité(s) pour évaluer les effets pathologiques autres que les tumeurs comprendra(ont) 20 animaux de chaque sexe, tandis que le groupe satellite témoin comprendra 10 animaux de chaque sexe.

Doses et fréquence d'exposition

Pour l'étude de la cancérogénèse, trois doses au moins seront utilisées, outre les groupes témoins correspondants. La dose supérieure devrait être suffisamment élevée pour montrer un effet de toxicité minimale tel qu'un faible ralentissement de la croissance du poids corporel (moins de 10%), sans altération notable de la durée de vie normale due à des effets autres que les tumeurs.

La dose la plus faible n'aura aucun effet sur la croissance, le développement et la longévité normale de l'animal et ne produira aucun effet toxique. En général, cette dose ne sera pas inférieure à 10% de la dose élevée.

La (les) dose(s) intermédiaire(s) aura (auront) une valeur proche de la moyenne entre la dose forte et la dose faible.

Les niveaux de dose prendront en compte les données fournies par les essais et les études de toxicité effectués antérieurement.

Pour l'étude de la toxicité chronique, on inclut dans l'étude d'autres groupes traités ainsi qu'un groupe satellite témoin correspondant. Pour les animaux du groupe satellite traité, la dose élevée sera choisie de manière à produire un effet toxique certain.

L'exposition est de façon générale quotidienne.

Si le produit chimique est administré dans l'eau de boisson ou incorporé à la nourriture, il devra être constamment disponible.

Témoins

Le groupe témoin sera en tous points identique au groupe traité, exception faite de l'exposition à la substance à tester.

Dans des conditions particulières, comme au cours des études par inhalation impliquant l'emploi d'aérosols ou l'utilisation d'un émulsifiant à activité biologique non étudiée au cours d'études par voie orale, on utilisera un groupe témoin supplémentaire non exposé au véhicule.

Voie d'administration

Les trois principales voies d'administration sont la voie orale, la voie dermique et la voie respiratoire (inhalation). Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance à tester ainsi que du mode probable de l'exposition humaine.

Études par voie orale:

La voie orale d'administration est préférée, sauf contre-indications, si la substance est absorbée par voie gastro-intestinale, et si l'ingestion est une voie d'exposition humaine. La substance à traiter sera administrée aux animaux dans leur nourriture, dissoute dans l'eau de boisson ou sous la forme de capsules.

Dans les conditions idéales, la dose quotidienne sera administrée 7 jours sur 7, car l'administration 5 jours sur 7 peut permettre à l'animal de récupérer ou à la toxicité de décroître durant la période où le traitement est interrompu et affecte, par conséquent, les résultats et l'évaluation ultérieure. Toutefois, pour des raisons essentiellement pratiques, on peut accepter que la substance soit administrée 5 jours sur 7.

Études par voie dermique:

L'exposition cutanée par badigeonnage de la peau peut être retenue pour simuler une voie d'exposition importante pour l'homme et comme une façon d'induire des lésions cutanées.

Études d'inhalation:

Les études d'inhalation posant des problèmes techniques beaucoup plus complexes que les autres voies d'administration, des recommandations plus détaillées sont formulées ici. Il convient également de noter que l'instillation intra-trachéale peut constituer une autre méthode valable dans certains cas spécifiques.

Les expositions prolongées sont habituellement établies en fonction de l'exposition humaine possible: les animaux sont soit exposés 5 jours sur 7 (exposition intermittente) à raison de 6 heures par jour après équilibrage des concentrations dans la cage d'expérimentation soit, si une exposition environnementale est possible chez l'homme, exposés 7 jours sur 7 (exposition continue) à raison de 22 à 24 heures par jour, une heure par jour environ étant consacrée à l'alimentation des animaux, selon un horaire régulier, et à l'entretien des cages d'expérimentation. Dans les deux cas, les animaux sont habituellement exposés à une concentration fixe de produits à tester. Une différence essentielle entre l'exposition intermittente et l'exposition continue réside dans le fait que dans le premier cas les animaux disposent d'une période de 17 à 18 heures pour récupérer des effets de l'exposition quotidienne et même d'une période plus longue durant les week-ends.

L'exposition intermittente ou permanente sera choisie en fonction des objectifs de l'étude et de l'exposition de l'être humain qui doit être simulée. Il convient toutefois de tenir compte de certaines difficultés techniques: par exemple, les avantages qu'offre l'exposition continue pour simuler les conditions ambiantes peuvent être contrebalancées par la nécessité d'alimenter et de faire boire les animaux durant l'exposition ainsi que par les contraintes inhérentes à la complexité (et fiabilité) de la génération des aérosols ou des vapeurs et des moyens de contrôle.

Enceintes d'exposition

Les animaux seront exposés à la substance à tester dans des cages d'inhalation conçues pour assurer un flux d'air dynamique d'au moins 12 renouvellements de l'air par heure, une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Les enceintes d'exposition et les enceintes témoins seront identiques du point de vue de la construction et de la conception afin de garantir des conditions d'exposition en tous points comparables, exception faite de l'exposition aux substances à tester. Une pression légèrement négative est généralement maintenue à l'intérieur de la chambre afin d'empêcher des fuites de la substance à tester dans la zone environnante. Les enceintes seront conçues de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de l'enceinte, le volume total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de l'enceinte d'exposition.

Mesures et contrôles à effectuer:

- (i) le débit d'air: le débit d'air dans la chambre fera, de préférence, l'objet d'un contrôle continu;
- (ii) concentration: durant la période d'exposition quotidienne, la concentration de la substance à tester ne variera pas de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne. Durant toute la durée de l'étude, les concentrations quotidiennes seront maintenues aussi constantes que possible;
- (iii) température et humidité: pour les rongeurs, la température sera maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et l'humidité à l'intérieur de l'enceinte sera de 30 à 70 %, sauf lorsqu'on utilise de l'eau pour mettre la substance à tester en suspension dans l'air de la cage d'exposition. Ces deux paramètres seront, de préférence, contrôlés en permanence;
- (iv) analyse granulométrique des particules: une répartition granulométrique des particules sera effectuée pour les atmosphères des chambres où des aérosols liquides ou solides sont utilisés. Les particules de l'aérosol seront d'une taille inhalable pour l'animal d'expérience utilisé. Des échantillons de l'air des cages d'exposition seront prélevés à la hauteur des voies respiratoires des animaux. L'échantillon d'air prélevé sera représentatif de la répartition des particules auxquelles les animaux sont exposés et représentera, sur une base gravimétrique, l'ensemble de l'aérosol en suspension, même si une grande partie de celui-ci n'est pas inhalable. Les analyses granulométriques seront effectuées fréquemment durant la mise au point du système générateur afin de veiller à la stabilité de l'aérosol, et ensuite aussi souvent que nécessaire pendant les expositions pour déterminer de façon adéquate la stabilité de la répartition des particules auxquelles les animaux ont été exposés.

Durée de l'étude

La partie de l'essai portant sur la cancérogénèse couvre la majeure partie de la durée de vie normale des animaux d'expérience. Elle durera 18 mois pour la souris et le hamster et 24 mois pour le rat; toutefois, pour certaines souches d'animaux ayant une plus grande longévité et/ou un faible taux de tumeurs spontanées, la durée sera de 24 mois pour la souris et le hamster et de 30 mois pour le rat. Il peut également être mis fin à une telle étude prolongée lorsque dans le groupe exposé à la dose la plus élevée ou dans le groupe témoin le nombre de survivants atteint 25 %. Lorsqu'il y a manifestement une réponse différente par sexe, chaque sexe sera considéré comme faisant l'objet d'une étude distincte. Lorsque seuls les sujets du groupe exposé à la dose la plus élevée meurent prématurément pour des raisons évidentes de toxicité, il n'est pas nécessaire de mettre fin à l'essai si les manifestations toxiques ne posent pas de problèmes dans les autres groupes. Pour qu'un résultat d'essai négatif soit acceptable, il faut que, par lot, il n'y ait pas plus de 10 % d'animaux perdus pour l'étude, pour cause d'autolyse, de cannibalisme ou de problèmes organisationnels et que le taux de survie dans tous les lots ne soit pas inférieur à 50 % après 18 mois en ce qui concerne la souris et le hamster et après 24 mois en ce qui concerne le rat.

Les groupes satellites de 20 animaux par sexe traités ainsi que les 10 animaux par sexe témoins qui y sont associés, utilisés pour l'essai de toxicité chronique seront conservés dans l'étude pendant au moins 12 mois. Ces animaux sont destinés à être sacrifiés afin d'évaluer la pathologie liée à la substance à tester en dehors de toute modification imputable au vieillissement.

Mode opératoire

Observations

Les observations quotidiennes sur les animaux en cage porteront notamment sur les modifications de la peau et du poil, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement.

Les animaux du (des) groupe(s) satellite(s) traité(s) seront soumis à un examen clinique à intervalles appropriés.

Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux pour éviter, autant que possible, toute perte pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur d'encagement. Les animaux moribonds seront immédiatement mis à part et autopsiés.

Les signes cliniques, y compris les modifications neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité seront notés pour tous les animaux. On accordera une attention spéciale à la formation de tumeurs; la date de formation et l'évolution des effets toxiques seront enregistrées; le moment de formation, la localisation, les dimensions, l'apparence et l'évolution de toute tumeur nettement visible ou palpable seront notés.

La consommation alimentaire (ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) sera déterminée chaque semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis tous les 3 mois environ, à moins que l'état de santé ou les modifications de poids corporel ne nécessitent une autre fréquence.

Les poids corporels seront relevés individuellement pour tous les animaux une fois par semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis une fois toutes les 4 semaines au moins.

Examen clinique

Examen hématologique

Un examen hématologique (par exemple, teneur en hémoglobine, hémocrite, nombre total d'érythrocytes, nombre total de leucocytes, plaquettes sanguines, ou autres mesures de la coagulation) sera effectué sur des échantillons de sang prélevés sur 10 rats/sexe de tous les groupes au troisième et au sixième mois, puis tous les six mois environ et enfin à l'issue de l'essai. Ces échantillons seront, si possible, prélevés chaque fois sur les mêmes rats.

Si les observations effectuées pendant la période d'encagement indiquent une détérioration de l'état de santé des animaux au cours de l'étude, la formule sanguine est établie sur les animaux affectés. La formule sanguine est réalisée avec des échantillons du lot à la plus forte dose et des témoins. Pour le (les) groupe(s) exposé(s) à la (aux) dose(s) immédiatement inférieure(s), une telle analyse n'est pratiquée que si l'on constate un écart important entre le groupe exposé à la dose la plus élevée et les témoins, ou si l'examen histopathologique le justifie.

Analyse des urines

Des échantillons d'urine seront collectés pour analyse sur 10 rats/sexe de tous les lots; ces analyses seront faites si possible en même temps que l'examen hématologique. Les déterminations suivantes seront faites soit sur les animaux individuellement soit, pour les rongeurs, sur un *pool* des urines du même lot et du même sexe:

- apparence: volume et densité pour les animaux pris individuellement,
- protéines, glucose, corps cétoniques, hémorragie occulte (semi-quantitativement),
- microscopie du sédiment urinaire (semi-quantitativement).

Chimie clinique

Tous les 6 mois environ ainsi qu'à l'issue de l'essai, des échantillons de sang sont prélevés, afin d'effectuer des déterminations biologiques, chez tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de tous les lots, si possible, chaque fois sur les mêmes rats. De plus, un échantillon sera prélevé sur tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs avant de commencer l'étude. Le plasma, préparé à partir de ces échantillons, est utilisé pour les déterminations suivantes:

- concentration en protéines totales,
- concentration en albumine,
- tests de la fonction hépatique [tels qu'activité de la phosphatase alcaline, activités SGPT ⁽¹⁾ et SGOT ⁽²⁾], gamma-glutamyl transpeptidase, ornithine-décarboxylase,
- métabolisme glucidique tel que glycémie à jeun,
- tests de la fonction rénale, tels que l'urée sanguine.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

Autopsie

Un examen complet sera effectué sur tous les animaux, y compris ceux morts en cours d'expérience ou sacrifiés à l'état moribond. Avant de sacrifier les animaux, des échantillons de sang seront prélevés sur tous les animaux afin d'établir la formule sanguine. Tous les organes ou tissus présentant des lésions macroscopiques visibles, des tumeurs ou des lésions soupçonnées d'être des tumeurs seront conservés. On tentera de mettre en corrélation les observations macroscopiques et microscopiques.

Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié permettant d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs: l'encéphale⁽¹⁾ (y compris sections de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral), hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée et poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie⁽¹⁾, rate, reins⁽¹⁾, glandes surrénales⁽¹⁾, pancréas, gonades⁽¹⁾, utérus, organes génitaux annexes, peau, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie, ganglions lymphatiques représentatifs, glande mammaire femelle, musculature de la cuisse, nerf périphérique, sternum avec moelle osseuse, fémur (y compris les articulations), moelle épinière à trois niveaux (cervical, médiathoracique et lombaire), yeux.

L'insufflation d'un fixateur dans les poumons et la vessie constitue la meilleure façon de conserver ces tissus, l'insufflation des poumons est absolument nécessaire dans les études d'inhalation si l'on veut procéder à des examens histopathologiques appropriés. Dans les études par inhalation, tout le tractus respiratoire sera conservé, y compris la cavité nasale, le pharynx et le larynx.

Si d'autres examens cliniques sont effectués, les informations obtenues seront communiquées avant de commencer les examens microscopiques, car elles peuvent fournir des indications précieuses au pathologiste.

Histopathologie

Pour la partie portant sur l'essai de toxicité chronique:

Tous les organes prélevés chez les animaux du groupe satellite exposé à la dose élevée ainsi que du groupe témoin seront soumis à un examen détaillé. Lorsqu'une pathologie liée à la substance à tester est observée sur le groupe satellite exposé à la dose élevée, les organes cibles de tous les autres animaux de tout autre groupe satellite traité seront soumis à un examen histologique complet et détaillé de même que ceux appartenant aux groupes traités dans le cadre de l'essai de cancérogénèse, à l'issue de cette partie de l'étude.

Pour la partie portant sur l'essai de carcinogénicité:

- a) Les organes et tissus de tous les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai ainsi que de tous les animaux du groupe témoin et du groupe exposé à la dose élevée seront soumis à un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les tumeurs nettement visibles ou les lésions soupçonnées d'être des tumeurs observées sur tout organe dans tous les groupes feront l'objet d'un examen microscopique.
- c) Si l'on observe une différence significative dans l'incidence des lésions néoplasiques dans le groupe exposé à la dose la plus élevée et le groupe témoin, un examen histopathologique sera effectué pour cet organe ou ce tissu particulier chez les animaux des autres groupes.
- d) Si le taux de survie dans le groupe exposé à la dose élevée est nettement inférieur à celui observé pour le groupe témoin, les animaux du groupe exposé à la dose immédiatement inférieure seront soumis à un examen complet.
- e) Si dans le groupe exposé à la dose élevée, on observe des effets toxiques ou autres susceptibles d'affecter la réponse néoplasique, les animaux exposés à la dose immédiatement inférieure seront soumis à un examen complet.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des tumeurs ou des manifestations toxiques décelées durant l'essai, le moment de cette détection et le nombre d'animaux présentant des tumeurs à l'autopsie. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique validée peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,

⁽¹⁾ Ces organes, prélevés sur 10 animaux par sexe et par lot dans le cas des rongeurs, seront pesés.

— conditions d'essais:

description du système d'exposition:

conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air expiré et, le cas échéant, mode de stabulation des animaux en chambres d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité et, si nécessaire, la stabilité de la concentration d'aérosols ou la granulométrie des particules seront décrits;

données relatives à l'exposition:

elles seront présentées sous forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:

- a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
- b) la température et l'humidité de l'air;
- c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
- d) le cas échéant, la nature du véhicule;
- e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
- f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),

— niveaux de doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,

— incidence des tumeurs par sexe, dose et type de tumeur,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore vivant à la fin de l'expérience, y compris animaux du groupe satellite,

— réponse toxique par sexe et dose,

— description des effets toxiques ou autres,

— moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,

— observations ophtalmologiques,

— consommation alimentaire et poids corporel,

— résultats de l'examen hématologique,

— résultats des épreuves de biochimie clinique (y compris analyse des urines),

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques,

— traitement statistique des résultats et description des méthodes utilisées,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 34 TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principes de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée à des doses croissantes à plusieurs groupes d'animaux mâles et femelles. Les mâles devraient être traités durant leur croissance et pendant au moins un cycle complet de spermatogenèse (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de permettre à la substance de produire quelques effets nocifs sur la spermatogenèse.

Les femelles de la génération P seront traitées pendant au moins deux cycles œstraux complets afin de permettre à la substance testée de produire quelques effets nocifs sur l'œstrus. Les animaux sont ensuite accouplés. La substance testée est administrée aux animaux des deux sexes pendant la période d'accouplement, puis uniquement aux femelles durant la période de gestion et d'allaitement. Si l'on veut administrer la substance par voie respiratoire (inhalation), la méthode nécessite des adaptations.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Avant l'essai, de jeunes animaux adultes et sains sont randomisés et répartis par groupes traités et témoins. Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Il est recommandé d'administrer la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson. D'autres voies d'administration sont également acceptables. La même méthode d'administration sera utilisée pour tous les animaux durant la période expérimentale appropriée. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le traitement, ils devraient être reconnus sans effet toxique. Le traitement devrait être effectué pendant les 7 jours de la semaine.

Animaux d'expérience

Choix de l'espèce:

L'espèce convenant le mieux est celle du rat ou de la souris. Des souches à faible taux de fécondité ne devraient pas être utilisées. Des animaux sains n'ayant pas été déjà utilisés dans une expérimentation devraient être utilisés. L'espèce, la souche, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience seront spécifiés.

Pour évaluer de façon adéquate la fécondité, mâles et femelles devraient tous deux être étudiés. Tous les animaux traités et témoins devraient être sevrés avant le début du traitement.

Nombre et sexe:

Chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait comporter un nombre d'animaux suffisant pour obtenir environ 20 femelles gravides arrivées à terme ou proches de celui-ci.

L'objectif est d'obtenir un nombre de gestations et de portées suffisant pour permettre une évaluation valable de l'influence de la substance sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel des animaux de la génération P ainsi que l'allaitement, la croissance et le développement de la génération F₁, de la conception au sevrage.

Conditions d'essai

La nourriture et l'eau devraient être fournies à satiété. Lorsqu'elles seront proches du terme, les femelles gravides devraient être placées dans des cages individuelles de mise bas ou de maternité et il peut leur être fourni les matériaux de nidification nécessaires.

Doses

Au moins trois groupes traités et un groupe témoin seront utilisés. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance testée, le groupe témoin recevra le volume maximal de véhicule ayant été utilisé. Si une substance à tester entraîne une réduction de la consommation alimentaire ou de l'assimilation, il peut être nécessaire d'utiliser un groupe témoin apparié. Dans les conditions idéales et à moins que la nature physique/chimique ou les effets biologiques de la substance testée ne s'y opposent dans une certaine mesure, le niveau de dose le plus élevé produira un effet toxique sans toutefois entraîner la mort des animaux parentaux (P). La(les) dose(s) intermédiaire(s) devrait(ent) produire des effets toxiques minima attribuables à la substance testée, et la dose faible ne devrait produire aucun effet nocif observable sur les parents ou leur progéniture. Lorsque la substance est administrée par gavage ou en capsule, la dose administrée à chaque animal devrait être établie en fonction du poids corporel de chaque animal et fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire afin de tenir compte des modifications de poids corporel. Pour les femelles pendant la gestation, le traitement peut, si on le souhaite, être établi en fonction du poids corporel au jour 0 ou au jour 6 de la gestation.

Essai de limite

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si un niveau de dose d'au moins 1 000 mg/kg n'entraîne aucune interférence sur les capacités de reproduction, des études à d'autres niveaux de doses peuvent être considérées non nécessaires. Si une étude préliminaire effectuée avec le niveau de dose élevé, avec une toxicité évidente chez la mère, n'a aucun effet nocif sur la fertilité, on peut juger inutile d'effectuer des études avec d'autres niveaux de doses.

Mode opératoire

Plan d'expérience

On devrait commencer à administrer quotidiennement la substance aux mâles géniteurs (P) lorsqu'ils auront atteint l'âge de 5 à 9 semaines, après qu'ils auront été sevrés et acclimatés pendant au moins 5 jours. Chez les rats, le traitement est poursuivi pendant 10 semaines, avant la période d'accouplement (pour les souris, 8 semaines). Les mâles devraient être sacrifiés et examinés soit à la fin de la période d'accouplement soit alternativement maintenus en vie avec poursuite de l'administration de la substance dans la nourriture, en vue de la production éventuelle d'une seconde portée, et devraient être sacrifiés et examinés à un moment avant la fin de l'étude. Dans le cas des femelles (P), le traitement devra commencer après au moins 5 jours d'acclimation et se poursuivre pendant au moins 2 semaines avant l'accouplement. Les femelles P devraient continuer à recevoir leur traitement quotidien durant les 3 semaines de la période d'accouplement, durant la gestation et jusqu'au sevrage des petits F₁. Des modifications du schéma de traitement peuvent être envisagées au cas où l'on disposerait d'autres informations sur la substance étudiée, comme l'induction du métabolisme ou la bio-accumulation.

Procédure d'accouplement

Dans les études de toxicité sur la fonction de reproduction, les accouplements peuvent se faire soit 1:1 (1 mâle, 1 femelle) soit 1:2 (1 mâle, 2 femelles).

Dans le cas d'un accouplement 1:1, une femelle sera placée avec le même mâle jusqu'à ce qu'elle soit gravide ou que les 3 semaines se soient écoulées. On examinera les femelles chaque matin afin de relever la présence de sperme ou de bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme le jour où l'on constate la présence de bouchon vaginal ou de sperme.

Tous les couples ayant failli à l'accouplement devraient être examinés afin de déterminer la cause de l'apparente stérilité.

Ceci peut impliquer des procédures qui permettent des conditions d'accouplement avec des mâles ou des femelles ayant déjà procréé, de procéder à un examen microscopique des organes de reproduction ou à un examen du cycle oestral ou de la spermatogenèse.

Taille de la portée

On laisse les animaux traités durant l'étude de fertilité mettre bas naturellement et élever librement leurs petits jusqu'au sevrage.

Quand une méthode d'homogénéisation des portées est effectuée, il est suggéré d'appliquer le programme suivant: entre le jour 1 et le jour 4 après la naissance, la taille de chaque portée peut être adaptée en éliminant, par sélection, des petits afin d'obtenir, dans toute la mesure du possible, 4 mâles et 4 femelles par portée.

Si le nombre de mâles ou de femelles ne permet pas d'obtenir 4 petits de chaque sexe par portée, un ajustement partiel peut être accepté (par exemple 5 mâles et 3 femelles). Des ajustements ne sont pas possibles pour les portées de moins de 8 petits.

Observations

Pendant toute la période d'essai, chaque animal devrait être observé au moins une fois par jour. Des modifications comportementales significatives, des signes de parturition difficile ou prolongée ainsi que tous les signes de toxicité, y compris la mortalité, devraient être enregistrés. Pendant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, la consommation alimentaire sera déterminée quotidiennement. Après la parturition et durant la lactation, la consommation alimentaire ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson devraient être déterminées le jour de la pesée des petits. Les mâles et les femelles P devraient être pesés le premier jour du traitement, puis toutes les semaines. Ces observations devraient être notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation devrait être calculée à partir du jour 0 de la gravidité. Chaque portée devrait être examinée dès que possible après la naissance afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, les mort-nés, les nouveau-nés vivants et la présence d'anomalies macroscopiques.

Les petits morts et les petits sacrifiés le quatrième jour devraient être conservés et examinés en vue de déceler d'éventuelles anomalies. Les petits vivants devraient être comptés et les portées pesées le matin qui suit la naissance ainsi que le quatrième et le septième jour, puis chaque semaine jusqu'au terme de l'étude, où les animaux devraient être alors pesés individuellement.

Les anomalies physiques ou comportementales observées chez les mères ou les petits seront enregistrées.

Pathologie

Autopsie

Au moment du sacrifice ou de la mort en cours d'étude, les animaux de la génération P devraient être soumis à un examen macroscopique afin de déceler toute anomalie structurelle ou toute modification pathologique; une attention particulière étant accordée aux organes de l'appareil de reproduction. Les petits, morts ou moribonds, seront examinés du point de vue des malformations.

Histopathologie

Les ovaires, l'utérus, le col utérin, le vagin, les testicules, l'épididyme, les vésicules séminales, la prostate, la glande coagulante, l'hypophyse et l'(les) organe(s) cible(s) de tous les animaux P seront conservés en vue d'un examen microscopique. Au cas où ces organes n'ont pas été examinés au cours d'autres études à dose multiple, ils devraient être soumis à l'examen histologique pour tous les animaux traités à la dose élevée, tous les animaux témoins ainsi que ceux morts en cours d'expérience, lorsque c'est faisable.

Les organes présentant des anomalies chez ces animaux devraient alors être examinés chez tous les autres animaux P. Dans ce cas, l'examen microscopique sera effectué pour tous les tissus présentant des modifications pathologiques macroscopiques. Comme suggéré dans les procédures d'accouplement, les organes reproducteurs des animaux soupçonnés de stérilité seront soumis à un examen microscopique.

2. RÉSULTATS

Les résultats peuvent être résumés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de mâles féconds, le nombre de femelles gravides, le type de modifications et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de modification.

Lorsque c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce/souche utilisée,
- réponse toxique par sexe et par dose, y compris fécondité, gestation et viabilité,

- moment de la mort en cours d'expérience ou indication si l'animal était encore en vie au moment prévu pour le sacrifier à l'issue de l'étude,
- tableau présentant les poids de chaque portée, les poids moyens des petits et les poids individuels des petits à l'issue de l'étude,
- effet toxique ou autre sur la reproduction, la descendance, la croissance post-natale,
- jour de l'observation de tout signe anormal et évolution subséquente,
- poids corporel des animaux P,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée des observations microscopiques,
- traitement statistique des résultats, quand cela est nécessaire,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

B. 35

TEST DE REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principes de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée à des doses graduées à plusieurs groupes d'animaux mâles et femelles. Les mâles de la génération P devraient être traités durant leur croissance et pendant au moins un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) de manière à déclencher un éventuel effet nocif de la substance à tester sur la spermatogenèse. Les femelles de la génération P devraient être traitées aux mêmes fins pendant au moins 2 cycles œstraux complets afin de permettre à la substance testée de produire quelques effets nocifs sur l'œstrus. Les animaux sont alors accouplés. La substance testée est administrée aux deux sexes pendant la période d'accouplement et ensuite seulement aux femelles pendant la gestation et la durée de la période d'allaitement. Au moment du sevrage, on continue à administrer la substance à la descendance F₁ durant sa croissance jusqu'à l'âge adulte, l'accouplement et la production d'une génération F₂, jusqu'au sevrage de la génération F₂. Si l'on veut administrer la substance à tester par voie respiratoire (inhalation), il faudra modifier la méthode.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Avant l'essai, les animaux sains sont randomisés et répartis en groupes traités et témoins. Les animaux géniteurs (P) sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Il est recommandé d'administrer la substance à tester dans la nourriture ou l'eau de boisson. D'autres voies d'administration sont également acceptables. La même méthode d'administration sera utilisée pour tous les animaux durant toute l'expérience. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le dosage, ils devraient être reconnus sans effets toxiques. Le traitement devrait être effectué pendant les 7 jours de la semaine.

Animaux d'expérience: sélection de l'espèce

L'espèce convenant le mieux est celle du rat ou de la souris. Des lignées à faible taux de fécondité ne devraient pas être utilisées. Des animaux sains n'ayant pas été déjà utilisés dans une expérimentation devraient être utilisés. L'espèce, la souche, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience seront spécifiés.

Pour évaluer de façon adéquate la fécondité, mâles et femelles devraient tous deux être étudiés. Tous les animaux traités et témoins devraient être sevrés avant le début du traitement.

Nombre et sexe:

Chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait comporter un nombre d'animaux suffisant pour obtenir environ 20 femelles gravides arrivées à terme ou proches de celui-ci. L'objectif est d'obtenir un nombre de gestations et de portées suffisant pour permettre une évaluation valable de l'effet de la substance sur la fécondité, la

gestation, le comportement maternel ainsi que l'allaitement, la croissance et le développement de la génération F₁ de la conception à la maternité, ainsi que le développement de leur descendance (F₂) jusqu'au sevrage.

Conditions d'essai

La nourriture et l'eau seront fournies à satiété. Lorsqu'elles seront proches du terme, les femelles gravides devraient être placées dans des cages de parturition ou de maternité individuelles et il peut leur être fourni les matériaux de nidification nécessaires.

Doses

On utilisera au moins 3 groupes traités et un groupe témoin. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance testée, le groupe témoin recevra le volume maximum de véhicule ayant été utilisé. Si une substance à tester entraîne une réduction de la consommation alimentaire et de l'assimilation, il peut être nécessaire d'utiliser un groupe témoin négatif. Dans les conditions idéales et à moins que la nature physique/chimique ou les effets biologiques de la substance testée ne s'y opposent, le niveau de doses le plus élevé produira un effet toxique mais pas la mort des animaux géniteurs (P). La (les) dose(s) intermédiaire(s) devrait(ent) produire les effets toxiques minimaux imputables à la substance à tester et la dose faible ne devrait produire aucun effet nocif observable sur les parents ou leur progéniture. Lorsque la substance est administrée par gavage ou en capsule, la dose administrée à chaque animal devrait être établie en fonction du poids corporel de celui-ci et fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire afin de tenir compte des modifications de poids corporel. Pour les femelles pendant la gestation, le traitement peut, si on le souhaite, être établi en fonction du poids corporel au jour 0 ou au jour 6 de la gestation.

Essai de limite

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si un niveau de dose d'au moins 1 000 mg/kg n'entraîne aucune interférence sur les capacités de reproduction, des études à d'autres niveaux de doses peuvent être considérées non nécessaires. Si une étude préliminaire effectuée avec le niveau de dose élevé, avec une toxicité évidente chez la mère, n'a aucun effet nocif sur la fertilité, on peut juger inutile d'effectuer des études avec d'autres niveaux de doses.

Mode opératoire

Plan d'expérience

On devrait commencer à administrer quotidiennement la substance aux mâles géniteurs (P) lorsqu'ils auront atteints l'âge de 5 à 9 semaines, après qu'ils auront été sevrés et acclimatés pendant au moins 5 jours. Chez les rats, le traitement est poursuivi pendant 10 semaines, avant la période d'accouplement (pour les souris, 8 semaines). Les mâles devraient être sacrifiés et examinés soit à la fin de la période d'accouplement soit alternativement maintenus en vie avec poursuite de l'administration de la substance dans la nourriture, en vue de la production éventuelle d'une seconde portée, et devraient être sacrifiés et examinés à un moment avant la fin de l'étude.

Dans le cas des femelles (P), le traitement devra commencer après au moins 5 jours d'acclimatation et se poursuivre pendant au moins 2 semaines avant l'accouplement. Les femelles P devraient continuer à recevoir leur traitement quotidien durant les 3 semaines de la période d'accouplement, durant la gestation et jusqu'au sevrage des petits F₁. Des modifications du schéma thérapeutique peuvent être envisagées au cas où l'on disposerait d'autres informations sur la substance étudiée, comme l'induction du métabolisme ou la bio-accumulation.

Le traitement des animaux F₁ commence au sevrage et se termine lorsqu'ils sont sacrifiés.

Procédure d'accouplement

Dans l'étude de la toxicité sur la fonction de reproduction, les accouplements seront réalisés soit 1:1 (1 mâle, 1 femelle) soit 1:2 (1 mâle, 2 femelles).

Dans le cas d'un accouplement 1:1, une femelle devrait être placée avec le même mâle jusqu'à ce qu'elle soit gravide ou que les trois semaines se soient écoulées. Les femelles seront examinées chaque matin afin d'observer la présence de sperme ou de bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme le jour où l'on constate la présence de bouchon vaginal ou de sperme.

Compte tenu de la spermatogenèse, la descendance F₁ ne sera pas accouplée avant au moins l'âge de onze semaines pour les souris, de treize semaines pour les rats. Pour accoupler la descendance F₁, on sélectionne au hasard un mâle et une femelle de chaque portée en vue d'un accouplement croisé avec un petit d'une autre portée du groupe exposé à la même dose afin de produire la génération F₂. Les mâles et les femelles F₁ non sélectionnés pour l'accouplement sont sacrifiés au moment du sevrage.

Tous les couples ayant failli à l'accouplement devraient être examinés afin de déterminer la cause de l'apparente stérilité. Ceci peut impliquer des procédures qui permettent des conditions d'accouplement avec des animaux ayant déjà procréé, de procéder à un examen microscopique des organes de reproduction ou à l'examen du cycle œstral ou de la spermatogenèse.

Taille de la portée

On laisse les animaux traités durant l'étude de fertilité mettre bas naturellement et élever librement leur progéniture jusqu'au sevrage.

Quand une méthode d'homogénéisation des portées est faite, il est suggéré de procéder ainsi: entre le jour 1 et le jour 4 après la naissance, la taille de chaque portée peut être adaptée en éliminant, par sélection, les petits supplémentaires afin d'obtenir, dans toute la mesure du possible, 4 femelles et 4 mâles par portée. Si le nombre de mâles ou de femelles ne permet pas d'obtenir 4 petits de chaque sexe par portée, un ajustement partiel peut être accepté (par exemple, 5 mâles et 3 femelles). Des ajustements ne sont pas possibles pour les portées de moins de 8 petits. Pour les portées F_2 , l'ajustement s'effectue de la même manière.

Observations

Pendant toute la période d'essai, chaque animal devrait être observé au moins une fois par jour. Des modifications comportementales significatives, des signes de parturition difficile ou prolongée ainsi que tout signe de toxicité, y compris la mortalité, devraient être enregistrés. Pendant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, on déterminera chaque jour la consommation alimentaire. Après la parturition et durant la lactation, la consommation alimentaire devrait être déterminée le jour de la pesée des petits. Les animaux géniteurs (P et F_1) devraient être pesés le premier jour du traitement, puis toutes les semaines. Ces observations seront notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation sera calculée à partir du jour 0 de la gravidité. Chaque portée devrait être examinée dès que possible après la parturition afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, les mort-nés, les nouveau-nés vivants et la présence d'anomalies macroscopiques. Les petits morts ainsi que ceux sacrifiés le quatrième jour devraient être conservés et examinés en vue de déceler d'éventuelles anomalies.

Les petits en vie seront comptés et les portées pesées le matin qui suit la naissance ainsi que le quatrième et le septième jour, puis chaque semaine jusqu'au terme de l'étude, où les animaux devraient être alors pesés individuellement. Les anomalies physiques ou comportementales observées chez les mères ou leur progéniture seront enregistrées.

Pathologie

Autopsie

Tous les animaux adultes P et F_1 devraient être sacrifiés lorsqu'ils cessent d'être nécessaires pour évaluer les effets sur la reproduction. La progéniture F_1 non retenue pour l'accouplement ainsi que toute la descendance F_2 devraient être sacrifiées au moment du sevrage.

Au moment du sacrifice ou de la mort en cours d'étude, tous les animaux géniteurs (P et F_1) devraient être soumis à un examen histologique afin de déceler toute anomalie structurelle ou toute modification pathologique, une attention particulière étant accordée aux organes de l'appareil de reproduction. Chez les petits, morts ou moribonds, on recherchera d'éventuelles malformations.

Histopathologie

Les ovaires, l'utérus, le col utérin, le vagin, les testicules, l'épididyme, les vésicules séminales, la glande coagulante, la prostate, l'hypophyse et l'(les) organe(s) cible(s) de tous les animaux P et F_1 sélectionnés pour l'accouplement seront conservés, le cas échéant, pour un examen microscopique. Si ces organes n'ont pas été examinés dans d'autres études à dose multiple, ils devraient être soumis à un examen histologique pour tous les animaux P et F_1 du groupe traité à la dose élevée et du groupe témoin sélectionnés pour l'accouplement ainsi que pour les animaux morts durant l'étude, lorsque c'est faisable. Les organes présentant des anomalies chez ces animaux seront examinés chez tous les animaux des groupes traités avec d'autres doses. Dans ce cas, un examen microscopique devrait être effectué pour tous les tissus présentant des modifications pathologiques macroscopiques. Comme suggéré dans les procédures d'accouplement, les organes de reproduction des animaux soupçonnés de stérilité peuvent être soumis à un examen microscopique.

2. RÉSULTATS

Traitement des résultats

Les résultats peuvent être résumés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux gravides, le type de modification et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de modification.

Lorsque c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèce/souche utilisée,
- réponse toxique par sexe et par dose, y compris indice de fécondité, de gestation et viabilité,
- moment de la mort en cours d'étude ou indication que l'animal était encore en vie au terme de l'étude,
- tableau présentant les poids de chaque portée, le poids moyen des petits et les poids individuels des petits à l'issue de l'étude,
- effet toxique ou autre sur la reproduction, la descendance, la croissance post-natale,
- jour de l'observation de tout signe anormal et évolution subséquente,
- poids corporel des animaux P et F, sélectionnés pour l'accouplement,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée des observations microscopiques,
- traitement statistique des résultats, si nécessaire,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

B. 36
TOXICOCINÉTIQUE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée par une voie appropriée. Suivant l'objectif poursuivi dans l'étude, la substance peut être administrée de façon unique ou répétée, pendant des périodes de temps déterminées, à un ou plusieurs groupes d'animaux d'expérience. La substance et/ou ses métabolites sont ensuite étudiés dans les liquides de l'organisme, les tissus et/ou les excréta.

Les études peuvent être effectuées avec des formes «marquées» ou «non marquées» de la substance à tester. En cas d'utilisation d'un marquage, la position de celui-ci dans la substance doit fournir un maximum d'informations sur le devenir du composé.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

De jeunes animaux adultes et en bonne santé sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience. Avant de commencer l'essai, les animaux sont randomisés et répartis entre les groupes soumis au traitement. Dans des conditions particulières, des animaux très jeunes, gravides ou prétraités peuvent être utilisés.

Conditions d'essai

Animaux d'expérience

Les études toxicocinétiques peuvent être effectuées sur une ou plusieurs espèces animales appropriées et il sera tenu compte des espèces utilisées ou qu'il est prévu d'utiliser dans d'autres études toxicologiques portant sur la même substance à tester. Lorsque des rongeurs sont utilisés pour un essai, la différence de poids entre les animaux ne dépassera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne.

Nombre et sexe

Pour les études d'absorption et d'excrétion, on utilisera au départ un lot de 4 animaux pour chaque dose. Le choix d'un sexe déterminé n'est pas obligatoire mais, dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire d'étudier des animaux des deux sexes. En cas de réponses différentes selon le sexe, 4 animaux de chaque sexe seront testés. S'il s'agit de non-rongeurs, un plus petit nombre d'animaux peut être utilisé. Lors de l'étude de la distribution dans les tissus, il sera tenu compte, pour fixer la taille initiale de l'échantillon traité, du nombre d'animaux à sacrifier à chaque date d'examen fixé, ainsi que du nombre d'examen à envisager.

Pour l'étude du métabolisme, la taille de l'échantillon traité sera adaptée aux besoins de cette étude. Pour les études à doses multiples et à plusieurs examens intermédiaires, il sera tenu compte, pour la taille de l'échantillon traité, du nombre d'examen et de sacrifices prévus; le groupe doit, toutefois, se composer d'au moins deux animaux. La taille de l'échantillon traité sera suffisante pour permettre une évaluation acceptable de l'augmentation du taux, du plateau et de la diminution du taux (le cas échéant) de la substance à tester et/ou de ses métabolites.

Doses

Dans le cas d'une administration unique, on utilisera au moins deux niveaux de dose, à savoir une dose faible pour laquelle on n'observe aucun effet toxique et une dose élevée susceptible de modifier les paramètres toxicocinétiques ou pour laquelle on observe des effets toxiques.

Dans le cas d'une administration répétée, la dose faible est habituellement suffisante mais, dans certaines circonstances, une dose élevée peut aussi s'avérer nécessaire.

Voie d'administration

Les études toxicocinétiques seront effectuées par la même voie et, le cas échéant, avec le même véhicule que celui utilisé ou envisagé pour les autres études de toxicité. La substance à tester est habituellement administrée par voie orale (gavage ou incorporation dans l'alimentation) par application sur la peau ou par inhalation, pendant des périodes de temps déterminées, à plusieurs lots d'animaux d'expérience. L'administration de la substance à tester par voie intraveineuse peut être utile pour déterminer l'absorption relative par les autres voies. De plus, des informations utiles sur le mode de distribution peuvent être obtenues peu après l'administration intraveineuse d'une substance.

La possibilité d'une interférence du véhicule avec la substance à tester sera prise en considération. Une attention particulière sera portée aux différences d'absorption selon que la substance à tester est administrée par gavage ou dans l'alimentation et l'on veillera à déterminer la dose avec précision, en particulier lorsque la substance à tester est incorporée à l'alimentation.

Période d'observation

Tous les animaux feront l'objet d'une observation journalière; les signes de toxicité et autres manifestations cliniques notables ainsi que le moment de leur apparition, leur gravité et leur durée, seront signalés.

Conduite de l'essai

Après avoir pesé les animaux d'expérience, on administre la substance à tester par une voie appropriée.

Absorption

Le taux et le degré d'absorption de la substance administrée peuvent être évalués par différentes méthodes, en présence et en l'absence de groupes de référence ⁽¹⁾, par exemple:

- détermination de la quantité de substance à tester et/ou de ses métabolites dans les *excreta*, tels que urine, bile, fèces, air expiré et dans le contenu de la carcasse,
- comparaison de la réponse biologique (par exemple, étude de toxicité aiguë) obtenue pour les groupes d'expérience, les groupes témoins et/ou les groupes de référence,
- comparaison de la quantité de substance et/ou de métabolites excrétés par les reins dans les groupes d'expérience et de référence,
- détermination de l'aire sous la courbe taux plasmatique/temps, de la substance à tester et/ou de ses métabolites et comparaison avec les données obtenues pour un groupe de référence.

⁽¹⁾ Dans cette méthode, on entend par groupe de référence un groupe auquel la substance à tester est administrée par une autre voie garantissant une disponibilité complète de la dose.

Distribution

Il existe actuellement deux méthodes pour analyser les modes de distribution, l'une des deux ou toutes les deux pouvant être utilisées:

- les techniques d'autoradiographie du corps entier fournissent des informations qualitatives utiles,
- le sacrifice des animaux, à des périodes différentes après leur exposition et la détermination de la concentration et de la quantité de substance à tester et/ou de ses métabolites dans les tissus et les organes fournissent des informations quantitatives.

Excrétion

Dans les études d'excrétion, on collecte l'urine, les fèces, l'air expiré et, dans certains cas, la bile. La quantité de substance à tester et/ou de métabolites présents dans ces *excreta* sera mesurée à plusieurs reprises après l'exposition, jusqu'à ce que 95 % environ de la dose administrée aient été éliminés, ou pendant sept jours consécutifs, si ce pourcentage n'est pas atteint avant.

Dans certains cas, il peut être nécessaire de tenir compte de la substance à tester éliminée dans le lait des animaux d'expérience qui allaitent.

Métabolisme

Des échantillons biologiques seront analysés par des méthodes adéquates afin de déterminer la voie métabolique et son intensité. Les structures des métabolites seront étudiées et des voies métaboliques appropriées seront proposées lorsqu'il y a lieu de répondre à des questions soulevées par des études toxicologiques antérieures. Il peut s'avérer utile d'effectuer des études *in vitro* en vue d'obtenir des informations sur les voies métaboliques.

Des informations complémentaires sur la relation entre le métabolisme et la toxicité peuvent être obtenues grâce à des études biochimiques telles que la détermination des effets sur des systèmes d'enzymes métabolisants, de la déplétion en composés endogènes à groupements sulfhydriles non protéiques, de la liaison avec les macromolécules.

2. RÉSULTATS

Selon le type d'étude effectuée, les données seront résumées sous la forme de tableaux étayés, le cas échéant, par des graphiques. Pour chaque groupe d'expérience, les variations moyennes et statistiques des mesures en fonction du temps, des doses, des tissus et des organes seront, le cas échéant, indiquées. Le degré d'absorption ainsi que les quantités excrétées et le rythme de l'excrétion seront déterminés par des méthodes appropriées. Lorsque des études du métabolisme sont effectuées, la structure des métabolites identifiés sera indiquée et les voies métaboliques possibles seront présentées.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

- espèces, souche, source, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- caractéristiques des produits marqués, si ceux-ci sont utilisés,
- niveaux de dose et intervalles utilisés,
- voie(s) d'administration et tout véhicule utilisé,
- effets toxiques et autres observés,
- méthodes permettant de déterminer la substance d'essai et/ou ses métabolites dans les échantillons biologiques, y compris l'air expiré,
- mise en tableaux des mesures effectuées par sexe, dose, régime, temps, tissus et organes,

- indication du degré d'absorption et d'excrétion en fonction du temps,
- méthodes de caractérisation et d'identification des métabolites dans les échantillons biologiques,
- méthodes utilisées pour les mesures biochimiques en rapport avec le métabolisme,
- voies proposées pour le métabolisme,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCE**

Voir introduction générale, partie B.

B.37 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'essais in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase - NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. Substances de référence

Une substance de référence peut être testée sur un lot témoin positif, afin de démontrer que, dans les conditions de l'essai, la réaction de l'espèce testée n'est pas modifiée de façon significative.

Le tri-o-tolyl phosphate est un exemple de produit neurotoxique couramment utilisé (n° CAS 78-30-8, n° EINECS 201-103-5, nomenclature CAS: acide phosphorique, tris(2-méthylphényl)ester); il est également connu sous le nom de tris-o-crésylphosphate.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée oralement, en une prise unique, à des poules domestiques qui ont été protégées, le cas échéant, contre des effets cholinergiques aigus. Les animaux sont observés pendant 21 jours pour détecter des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après administration. 21 jours après l'exposition, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur des tissus nerveux choisis.

1.5. Description de la méthode d'essai

1.5.1. Préparation

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard en lots d'expérience et lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se mouvoir librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester est généralement administrée oralement, par gavage ou dans des capsules de gélatine, ou par une méthode comparable. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.5.2. Conditions de l'essai

1.5.2.1. Animaux d'expérience

L'espèce recommandée est la poule pondeuse domestique adulte jeune âgée de 8-12 mois (*Gallus gallus domesticus*). Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se mouvoir librement.

1.5.2.2. Nombre et sexe

Outre le lot d'expérience, il faut prévoir un lot témoin recevant le véhicule seul et un lot témoin positif. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester. Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les déterminations biochimiques (trois à chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation de 21 jours.

Le lot témoin positif peut être réalisé en parallèle ou provenir d'expériences antérieures récentes. Il doit se composer d'au moins six poules traitées par un produit neurotoxique connu à effet retardé; trois poules seront réservées aux examens biochimiques et trois à la recherche de signes pathologiques. La mise à jour périodique des données historiques recueillies antérieurement est recommandée. De nouveaux lots positifs devront être réalisés si une des conditions essentielles de l'expérience (par exemple souches, alimentation, hébergement) a été modifiée par le laboratoire chargé de l'essai.

1.5.2.3. Niveau de doses

Il convient d'effectuer une étude préliminaire sur un nombre approprié de poules réparties dans des lots traités à différentes doses, afin de déterminer la dose à utiliser pour l'étude principale. Un certain taux de mortalité est inévitable dans cette étude préliminaire. Toutefois, pour éviter la mort consécutive à des effets cholinergiques aigus, il est possible d'utiliser de l'atropine ou un autre agent protecteur ne perturbant pas la réaction neurotoxique différée. Diverses méthodes d'essai peuvent être utilisées pour évaluer la dose non létale maximale d'une substance (voir méthode B.1bis). Les données recueillies antérieurement sur les poules ou d'autres informations toxicologiques peuvent également être utiles pour déterminer la dose.

La dose utilisée dans l'étude principale doit être aussi élevée que possible, compte tenu des résultats de l'étude préliminaire et de la limite supérieure de 2 000 mg/kg poids corporel. Quel que soit le taux de mortalité, il doit subsister un nombre suffisant d'animaux pour effectuer les analyses biochimiques (six) et l'examen histologique (six) au 21^{ème} jour. Il convient d'utiliser de l'atropine ou un autre agent qui ne perturbe pas les réactions neurotoxiques différées, afin d'éviter la mort par effets cholinergiques aigus.

1.5.2.4. Essai limite

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 2 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure voisine ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.5.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre sur 21 jours.

1.5.3. Mode opératoire

Après administration d'un agent protecteur pour éviter que des effets cholinergiques aigus n'entraînent la mort, la substance à tester est administrée en une prise unique.

1.5.3.1. Observation générale

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées soigneusement plusieurs fois au cours des deux premiers jours, puis au moins une fois par jour, pendant 21 jours ou jusqu'à la date prévue du sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être notés, ainsi que la date d'apparition des troubles du comportement, leur type, leur gravité et leur durée. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être notée. Au moins deux fois par semaine, les poules destinées à la recherche des signes pathologiques doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles par exemple, afin de faciliter l'observation de faibles manifestations de toxicité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

1.5.3.2. Poids corporel

Toutes les poules sont pesées juste avant l'administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.5.3.3. Biochimie

Six poules choisies au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins négatifs, ainsi que trois poules prélevées dans le lot témoin positif (si l'essai est réalisé en parallèle sur ce dernier) sont sacrifiées quelques jours après administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies. Il peut en outre s'avérer utile d'analyser l'inhibition de cette estérase sur du nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées après 24 heures et trois autres après 48 heures, tandis que les trois poules du lot témoin positif sont sacrifiées après 24 heures. Si l'observation des signes cliniques d'intoxication (souvent estimés par le moment d'apparition des effets cholinergiques) indique que la substance toxique est éliminée très lentement, il peut s'avérer préférable de prélever les tissus sur trois poules à deux autres temps compris entre 24 heures et au plus tard 72 heures après administration.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur des échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase *in vivo*, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

1.5.3.4. Autopsie

L'autopsie de tous les animaux (sacrifices prévus ou exigés par l'état de l'animal) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.5.3.5. Examen histopathologique

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région lombo-sacrée. Des coupes devront également être réalisées dans la partie distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles gastrocnémiens, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones.

2. RÉSULTATS

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents points d'évaluation retenus (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est normalement pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être présentés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou troubles, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou trouble aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins. Les résultats numériques seront évalués par des méthodes statistiques appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. COMPTE RENDU

Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- souche utilisée,
- nombre d'animaux et âge,
- origine, conditions d'hébergement, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'expérience.

Conditions expérimentales:

- détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,
- justification du choix du véhicule,
- détails concernant l'administration de la substance à tester,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,
- identité de l'agent protecteur éventuel et détails concernant son administration.

Résultats:

- données relatives au poids corporel,
- données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,

- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 418 de l'OCDE.

B.38 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'études in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Cet essai de neurotoxicité retardée sur 28 jours fournit des informations sur d'éventuels dangers pour la santé pouvant découler d'expositions répétées au cours d'une période déterminée. Il donnera des informations sur la relation dose-effet et pourra fournir une estimation du niveau de dose sans effet néfaste observé, pouvant être utile à l'établissement des critères de sécurité pour l'exposition.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase - NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à des poules domestiques pendant 28 jours. Les animaux sont observés au moins une fois par jour pour rechercher des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie, et ce jusqu'au 14^{ème} jour après administration de la dernière dose. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après la dernière administration. Deux semaines après la dernière administration, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur certains tissus nerveux.

1.4. Description de la méthode d'essai

1.4.1. Préparation

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard entre les lots d'expérience et les lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se déplacer librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester doit être administrée par voie orale chaque jour, sept jours sur sept, de préférence par gavage ou dans des capsules de gélatine. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire,

déterminées avant le début de l'essai.

1.4.2. Conditions de l'essai

1.4.2.1. Animaux d'expérience

Il est recommandé d'utiliser de jeunes poules pondeuses adultes (*Gallus gallus domesticus*) âgées de 8 à 12 mois. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se déplacer librement.

1.4.2.2. Nombre et sexe

En règle générale, il faut prévoir au moins trois lots d'expérience et un lot témoin recevant uniquement le véhicule. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les analyses biochimiques (trois lors de chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation post-traitement de 14 jours.

1.4.2.3. Doses

Les doses doivent être sélectionnées en tenant compte des résultats d'un essai de neurotoxicité retardée après exposition aiguë et de toute autre information disponible concernant la toxicité ou la cinétique de la substance à tester. La dose la plus élevée doit être choisie dans le but de produire des effets toxiques et de préférence une neurotoxicité différée, sans entraîner la mort ni des souffrances manifestes. Il convient ensuite de définir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une dose minimale n'entraînant aucun effet observable.

1.4.2.4. Essai limite

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure apparentée ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.4.2.5. Période d'observation

Tous les animaux doivent être observés au moins une fois par jour pendant la période d'exposition et pendant les 14 jours suivants, sauf si une autopsie est prévue.

1.4.3. Mode opératoire

La substance à tester est administrée tous les jours, sept jours sur sept, pendant 28 jours.

1.4.3.1. Observation générale

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées attentivement au moins une fois par jour pendant les 28 jours de traitement et pendant les 14 jours suivants ou jusqu'à la date prévue de leur sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être consignés, ainsi que leur date d'apparition, leur type, leur gravité et leur durée. L'observation doit porter sur les troubles du comportement, sans toutefois s'y limiter. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être consignée. Au moins deux fois par semaine, les poules doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles, par exemple, afin de faciliter l'observation des effets toxiques minimaux. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

1.4.3.2. Poids corporel

Toutes les poules sont pesées juste avant la première administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.4.3.3. Biochimie

Six poules prélevées au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins recevant le véhicule seul sont sacrifiées quelques jours après la dernière administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase

caractéristique des neuropathies (NTE). Il peut en outre s'avérer utile de rechercher l'inhibition de cette estérase sur le nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées 24 heures après la dernière administration et trois autres 24 heures plus tard, soit 48 heures après la dernière administration; si les résultats de l'étude par exposition aiguë ou d'autres études (étude toxicocinétique, par exemple) indiquent qu'il est préférable de choisir d'autres temps de sacrifice, les temps de sacrifices seront modifiés en conséquence et les documents justificatifs seront fournis.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur ces échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

1.4.3.4. Autopsie

L'autopsie de tous les animaux (sacrifice programmé ou imposé par l'état des animaux) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.4.3.5. Examen histopathologique

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région sacro-lombaire. Des coupes devront également être réalisées dans la région distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles jumeaux du triceps, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones. Dans un premier temps, l'examen microscopique sera effectué sur les tissus conservés de tous les animaux du lot traité à la dose la plus élevée et du lot témoin. Si des effets sont mis en évidence dans le lot traité à la dose la plus élevée, l'examen microscopique devra également porter sur les tissus des animaux des lots traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

2. RÉSULTATS

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents critères d'évaluation retenus dans cette méthode (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou symptômes, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou symptôme aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. COMPTE RENDU

Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

- souche utilisée,
- nombre d'animaux et âge,
- origine, conditions d'hébergement, etc.,

- poids de chaque animal au début de l'expérience.

Conditions expérimentales:

- détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,

- justification du choix du véhicule,

- détails concernant l'administration de la substance à tester,

- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,

- justification du choix de la dose,

- spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,

- si les déterminations biochimiques ne sont pas pratiquées 24 et 48 heures après la dernière administration, justification du choix d'autres temps.

Résultats:

- données relatives au poids corporel,

- données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,

- niveau de dose sans effet néfaste observé,

- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),

- description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,

- résultats de l'autopsie,

- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 419 de l'OCDE.

B.39. ESSAI *IN VIVO* DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES

HEPATIQUES DE MAMMIFERE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 486, Essai *in vivo* de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules hépatiques de mammifères (1997).

1.1 INTRODUCTION

L'essai *in vivo* de synthèse non programmée de l'ADN (unscheduled DNA synthesis, UDS) sur cellules hépatiques de mammifère est destiné à identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN dans les cellules hépatiques des animaux traités (1, 2, 3, 4).

Cet essai *in vivo* constitue une méthode d'étude des effets génotoxiques des substances chimiques dans le foie. L'effet mesuré témoigne de l'altération de l'ADN et de la réparation qui en résulte dans les cellules hépatiques. Comme le foie est généralement le principal site du métabolisme des substances absorbées, il constitue un site approprié pour la détermination *in vivo* des altérations de l'ADN.

Il ne faut pas avoir recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

La synthèse non programmée de l'ADN (UDS) est mesurée en déterminant l'incorporation de nucléosides marqués dans les cellules qui ne subissent pas une synthèse programmée (phase S) de l'ADN. La technique la plus couramment utilisée est la détermination par autoradiographie de l'incorporation de thymidine marquée au tritium (³H-TdR). On utilise de préférence le foie de rat pour les essais UDS *in vivo*. D'autres tissus peuvent être utilisés mais ne font pas l'objet de cette méthode.

La détection d'une UDS dépend du nombre de bases d'ADN excisées et remplacées au site de l'altération. Ainsi, l'essai UDS est particulièrement utile pour détecter la réparation de longues séquences (20-30 bases) induite par la substance. Par contre, la réparation de courtes séquences (1-3 bases) est détectée avec une sensibilité beaucoup plus faible. En outre, des événements mutagènes peuvent résulter d'une non-réparation, d'une réparation erronée d'altérations de l'ADN ou d'une répllication erronée. L'ampleur de l'UDS ne fournit aucune indication quant à la fidélité du processus de réparation. D'autre part, il est possible qu'un mutagène réagisse avec l'ADN sans que l'altération de celui-ci soit réparée par un processus de réparation par excision. Le fait que l'essai UDS ne fournit pas d'informations spécifiques sur l'activité mutagène est compensé par la sensibilité potentielle de ce critère parce qu'il est mesuré dans la totalité du génome.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DEFINITIONS

Cellules en réparation: nombre net de grains (NNG) supérieur à une valeur préétablie à justifier par le laboratoire effectuant l'essai.

Nombre net de grains (NNG): mesure quantitative de l'activité UDS de cellules lors d'essais UDS autoradiographiques; calculé en soustrayant du nombre de grains nucléaires (GN) le nombre moyen de grains cytoplasmiques dans des zones cytoplasmiques équivalentes au noyau (GC): $NNG = GN - GC$. Les NNG sont calculés pour les cellules individuelles, puis regroupés pour les cellules d'une culture, de cultures parallèles, etc.

Synthèse réparatrice de l'ADN (UDS): synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région lésée par des substances chimiques ou physiques.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

L'essai UDS *in vivo* sur cellules hépatiques de mammifère indique une synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région altérée par des substances chimiques ou physiques. L'essai repose généralement sur l'incorporation de ³H-TdR dans l'ADN de cellules hépatiques qui présentent une faible fréquence de cellules dans la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de ³H-TdR est généralement déterminée par autoradiographie dans la mesure où cette technique n'est pas sensible aux interférences dues aux cellules en phase S comme c'est le cas du comptage en scintillation liquide, par exemple.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE

1.4.1 **Préparations**

1.4.1.1 *Sélection de l'espèce animale*

Le rat est communément utilisé, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches de laboratoire courantes. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2 *Conditions de stabulation et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60%.

1.4.1.3 *Préparation des animaux*

De jeunes adultes sains sont répartis par randomisation entre les groupes des animaux témoins et traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Ils sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.1.4 *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2 **Conditions expérimentales**

1.4.2.1 *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2 *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) doivent être inclus dans chaque partie indépendante de l'expérience. Les animaux des groupes témoins sont traités exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent être des substances dont on sait qu'elles produisent une UDS à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les témoins positifs pour lesquels une activation métabolique est nécessaire doivent être utilisés à des doses qui donnent lieu à une réponse modérée (4). Les doses peuvent être choisies de façon que les effets soient évidents et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Moment de prélèvement	Substance	N° CAS	N° EINECS
Précoce (2-4 heures)	N-nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-249-8
Tardif (12-16 heures)	N-2-fluorénylacétamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. L'administration du témoin positif par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai est acceptable

1.5 **MODE OPERATOIRE**

1.5.1 **Nombre et sexe des animaux**

Il convient d'utiliser un nombre adéquat d'animaux afin de tenir compte de variations biologiques naturelles de la réponse à l'essai. Il doit y avoir au moins 3 animaux analysables par groupe. Lorsqu'on dispose d'une importante quantité de données historiques, les groupes témoins négatifs et positifs peuvent ne comprendre que 1 ou 2 animaux.

Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre sexes, on peut effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, de préférence des mâles. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2 **Modalités de traitement**

Les substances d'essai sont généralement administrées en une seule fois.

1.5.3 **Niveaux de dose**

Normalement, on utilise au moins deux niveaux de dose. La dose la plus élevée est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant les mêmes modalités, seraient létales. En général, la dose plus faible est de 50 % à 25 % de la dose élevée.

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception à ces critères d'établissement de doses et doivent être évaluées au cas par cas. Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et le même schéma de traitement que ceux de l'étude principale.

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans le foie (noyaux pycnotiques, par exemple).

1.5.4 **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5 **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. La voie péritonéale n'est toutefois pas recommandée, étant donné qu'elle peut conduire à une exposition directe du foie à la substance d'essai plutôt que par l'intermédiaire du système circulatoire. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6 **Préparation des cellules hépatiques**

Les cellules hépatiques des animaux traités sont normalement préparées 12-16 heures après le traitement. Un prélèvement supplémentaire effectué plus tôt (normalement 2-4 heures après le traitement) est en général nécessaire, à moins qu'il y ait une réponse manifestement positive après 12-16 heures. Toutefois, d'autres délais de prélèvement peuvent être utilisés s'ils sont justifiés sur la base de données toxicocinétiques.

Les cultures à court terme de cellules hépatiques de mammifère sont habituellement établies en perfusant le foie *in situ* avec la collagénase et en laissant les cellules fraîchement dissociées se fixer sur une surface appropriée. Les cellules hépatiques des témoins négatifs doivent présenter une viabilité (5) d'au moins 50 pour cent.

1.5.7 **Détermination de l'UDS**

Les cellules hépatiques de mammifère fraîchement isolées sont généralement incubées dans un milieu contenant du ³H-TdR pendant une durée appropriée (3-8 heures, par exemple). À la fin de la période d'incubation, le milieu est enlevé des cellules, qui peuvent ensuite être incubées avec un milieu contenant un excès de thymidine non marquée, afin de réduire la radioactivité non incorporée ("cold chase"). Les cellules sont ensuite rincées, fixées et séchées. Pour les périodes d'incubation plus longues, la "cold chase" n'est pas absolument nécessaire. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique, maintenues dans l'obscurité (réfrigérées pendant 7-14 jours, par exemple), développées et colorées. On procède ensuite au comptage des grains d'argent. On prépare deux à trois lames pour chaque animal.

1.5.8 Analyse

Les préparations sur lame doivent contenir un nombre suffisant de cellules de morphologie normale pour qu'une évaluation probante de l'UDS soit possible. Les préparations sont examinées au microscope en vue de la recherche de signes de cytotoxicité manifeste (pynose, diminution du niveau de marquage radioactif, par exemple).

Les lames doivent être codées avant le comptage des grains. On analyse normalement 100 cellules de chaque animal sur au moins deux lames; l'analyse d'un nombre inférieur à 100 cellules/animal doit être justifié. Le nombre de grains n'est pas déterminé pour les noyaux en phase S, mais la proportion de cellules en phase S peut être enregistrée.

Le niveau d'incorporation de $^3\text{H-TdR}$ dans le noyau et le cytoplasme des cellules morphologiquement normales, tel qu'il est mis en évidence par le dépôt de grains d'argent, doit être déterminé à l'aide de méthodes appropriées.

Le nombre de grains est déterminé au niveau du noyau (grains nucléaires, GN) et des zones du cytoplasme équivalentes au noyau (grains cytoplasmiques, GC). Le nombre de GC est déterminé sur la base soit de la région du cytoplasme la plus fortement marquée, soit de la moyenne de deux ou trois régions proches du noyau choisies au hasard. D'autres méthodes de comptage (cellules entières, par exemple) peuvent être utilisées si on peut les justifier (6).

2. RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux. Le nombre net de grains (NNG) doit être déterminé pour chaque cellule, chaque animal, chaque dose et chaque temps de prélèvement en soustrayant le nombre de GC du nombre de GN. Si des "cellules en réparation" sont comptées, les critères pour définir les "cellules en réparation" doivent être justifiés et se fonder sur des données historiques ou sur des témoins négatifs concomitants. Les résultats numériques peuvent être évalués à l'aide de méthodes statistiques. Dans ce cas, il faut choisir et justifier les tests statistiques avant la réalisation de l'étude.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Exemples de critères permettant de conclure à une réponse positive ou négative:

- | | | |
|----------|------|---|
| positive | (i) | valeur NNG supérieure à un seuil préétabli justifié sur la base des données historiques du laboratoire; |
| | (ii) | valeur NNG significativement supérieure à celle du témoin concomitant; |
| négative | (i) | valeur NNG inférieure ou égale au seuil des contrôles historiques; |
| | (ii) | valeur NNG non significativement supérieure à celle du témoin concomitant. |

Il convient de prendre en considération la pertinence biologique des données (paramètres tels que la *variation interindividuelle*, la relation dose-réponse et la cytotoxicité). L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Un résultat positif à l'essai UDS *in vivo* sur cellules hépatiques de mammifère indique que la substance d'essai induit des altérations de l'ADN dans les cellules hépatiques de mammifère *in vivo* qui peuvent être réparées par la synthèse non programmée de l'ADN *in vitro*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'altération de l'ADN détectable par cet essai.

Le fait que la substance d'essai atteigne la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions de stabulation, régime alimentaire, etc.,
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix de la voie d'administration,
- méthodes pour vérifier que la substance a atteint la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,
- description détaillée des schémas de traitement et de prélèvement,

- méthodes de mesure de la toxicité,
- méthode de préparation et de culture des cellules hépatiques,
- technique autoradiographique utilisée,
- nombre de lames préparées et nombre de cellules analysées,
- critères d'évaluation,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

- valeurs moyennes du nombre de grains nucléaires, du nombre de grains cytoplasmiques et du nombre net de grains pour chaque lame, animal et groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- évaluation statistique, le cas échéant,
- signes de toxicité,
- données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,
- données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- nombre de "cellules en réparation", s'il a été déterminé,
- nombre de cellules en phase S, s'il a été déterminé,
- viabilité des cellules.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1-18.
2. Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.* 189, 123-133.
3. Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen*, 4, 553-562.

B.40. CORROSION CUTANEE

1. MÉTHODE

1.1 INTRODUCTION

Le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA) du Centre commun de recherche de la Commission européenne a reconnu la validité scientifique de deux essais *in vitro* de corrosivité cutanée, l'essai de résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat et un essai utilisant un modèle de peau humaine (1)(2)(3). L'étude de validation du CEVMA a montré que les deux essais permettent de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau. En outre, le protocole d'essai basé sur un modèle de peau humaine a permis de faire une distinction correcte entre les différents degrés de corrosivité (substances très corrosives pour la peau, R35, et autres substances corrosives pour la peau, R34) (2). La description et le mode opératoire sont présentés pour chacun des deux essais; le choix de l'essai dépend des exigences et préférences de l'utilisateur.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2 DÉFINITIONS

Corrosion cutanée: la survenue de lésions irréversibles de la peau après l'application d'un matériel d'essai.

1.3 SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune substance de référence n'est spécifiée, mais voir les points 1.5.3.4 et 1.7.2.3.

1.4 PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI - ESSAI RET SUR PEAU DE RAT

Le matériel d'essai est appliqué pendant 24 heures sur la surface épidermique de disques cutanés prélevés sur la peau de jeunes rats sacrifiés de façon humaine. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur capacité de provoquer une perte d'intégrité du stratum corneum normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET inhérente jusqu'à un niveau situé en dessous d'une valeur seuil ($5k\Omega$) (4)(5). Les matières irritantes et non irritantes ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Pour les substances tensio-actives et les substances organiques neutres, une étape de fixation d'un colorant peut être incluse dans la procédure d'essai (pour la définition, voir la référence (6)) afin de réduire le nombre de faux positifs obtenus spécifiquement avec ces types de substances chimiques (2) (7).

1.5 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI - ESSAI RET SUR PEAU DE RAT

1.5.1 Animaux

De jeunes (20-23 jours) rats (Wistar ou souche comparable) sont nécessaires pour la préparation des disques cutanés. Les poils du dos et des flancs sont coupés soigneusement à l'aide d'une petite tondeuse pour animaux. Les animaux sont ensuite lavés, la zone tonduée étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième et le quatrième jour après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours (pour la préparation de la peau, les animaux ne doivent pas être âgés de plus de 31 jours).

1.5.2 Préparation des disques cutanés

Les animaux sont sacrifiés de façon humaine. On prélève la peau dorsale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. La peau est placée sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir monté à force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la figure 1. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé de manière étanche à l'extrémité du tube PTFE à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (figure 2).

1.5.3 Mode opératoire

1.5.3.1 Application du matériel d'essai

Des substances d'essai liquides (150 µl) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube (figure 2). Pour l'essai de matières solides, une quantité suffisante du solide est appliquée sur le disque cutané pour que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 µl), on agite le tube doucement. Le contact entre les substances d'essai et la peau doit être maximal. Dans le cas de certains solides, ceci peut être obtenu en chauffant à 30 °C pour faire fondre la substance d'essai ou en la broyant pour obtenir une matière granulaire ou poudreuse.

On utilise trois disques cutanés pour chaque substance d'essai. Celle-ci est appliquée pendant 24 heures (voir aussi 1.5.3.4), puis éliminée par lavage avec un jet d'eau courante à 30 °C. L'élimination des substances d'essai qui se sont solidifiées dans le tube peut être facilitée par un lavage avec un jet d'eau chaude à 30 °C.

1.5.3.2 Mesures RET

La RET est mesurée à l'aide d'un pont de mesure en courant alternatif basse tension (par exemple AIM 401 ou 6401, ou équivalent). Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension superficielle de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol en renversant le tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en kΩ/disque cutané (figure 2). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode en dessous des pinces crocodiles sont indiquées à la figure 1. La pince maintenant l'électrode intérieure (épaisse) repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure (fine) est introduite dans la chambre réceptrice de telle manière qu'elle repose sur le fond de celle-ci. La distance entre la partie inférieure de la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (figure 1), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue.

Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 kΩ, ceci peut être dû au fait que la substance d'essai recouvre la surface épidermique du disque cutané. On peut essayer d'y remédier, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ; on élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une solution fraîche.

Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués concomitamment se situent dans les fourchettes acceptables pour la méthode. Les substances de contrôle proposées et leur fourchette acceptable pour la méthodologie et l'appareillage décrits sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Résistance (kΩ)
Positif	10 M acide chlorhydrique (36 %)	0,5 - 1,0
Négatif	Eau distillée	10 - 25

1.5.3.3 Mode opératoire modifié pour substances tensio-actives et substances organiques neutres

Si les valeurs RET de substances d'essai qui sont des substances tensio-actives ou des substances organiques neutres sont inférieures ou égales à 5 kΩ, on peut évaluer la pénétration d'un colorant dans les tissus. Cette procédure déterminera si les résultats sont des faux positifs (2).

1.5.3.3.1 Application et élimination du colorant sulforhodamine B

Après traitement initial avec la substance d'essai, 150 µl d'une dilution à 10 % (p/v) de sulforhodamine B dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque cutané pendant 2 heures. Les disques cutanés sont lavés ensuite avec un jet d'eau courante à la température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire/non fixé. Chaque disque cutané est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout le colorant non fixé. Après avoir répété cette opération de rinçage, on enlève les disques cutanés et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C. Après incubation, chaque disque cutané est enlevé et jeté et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 21 °C (force centrifuge relative ~ 175). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

1.5.3.3.2 Calcul de la teneur en colorant

La teneur de chaque disque en sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 565 nm = $8,7 \times 10^4$; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque cutané et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés. Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués concomitamment se situent dans la fourchette acceptable pour la méthode. Les fourchettes acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Teneur en colorant (µg/disque)
Positif	10 M acide chlorhydrique (36 %)	40 - 100
Négatif	Eau distillée	15 - 35

1.5.3.4 Informations complémentaires

Les substances d'essai peuvent aussi être appliquées sur les disques cutanés pendant des durées plus courtes (2 heures, par exemple) pour identifier les matières fortement corrosives. Cependant, dans l'étude de validation, on a constaté que l'essai RET surestimait le potentiel corrosif de plusieurs substances chimiques après leur application pendant 2 heures (2), alors qu'il assurait une identification correcte des substances corrosives et non corrosives après une application pendant 24 heures.

Les propriétés et les dimensions de l'appareillage et le mode opératoire utilisés peuvent influencer les valeurs RET obtenues. Le seuil de corrosivité a été fixé à 5 kΩ sur la base de données obtenues avec l'appareillage et le mode opératoire spécifiques décrits dans cette méthode. Des valeurs de seuil et de contrôle différentes seront éventuellement nécessaires en cas de changement important des conditions d'essai. Par conséquent, il est recommandé d'étalonner la méthodologie et la valeur seuil de résistance en testant une série de substances standard de référence choisies parmi les substances chimiques utilisées dans l'étude de validation (3).

1.6 PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI - ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE

Le matériel d'essai est appliqué localement pendant 4 heures sur un modèle tridimensionnel de peau humaine comprenant un épiderme reconstitué avec un stratum corneum fonctionnel. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur capacité de réduire la viabilité cellulaire (déterminée, par exemple, à l'aide de l'essai de réduction du MTT) en dessous de valeurs seuils définies pour des périodes d'exposition déterminées. Le principe de l'essai concorde avec l'hypothèse selon laquelle les substances chimiques qui sont corrosives sont celles qui sont capables de pénétrer dans le stratum corneum (par diffusion ou érosion) et sont suffisamment cytotoxiques pour provoquer la mort cellulaire dans les couches cellulaires sous-jacentes.

1.7 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI - ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE

1.7.1 Modèles de peau humaine

Les modèles de peau humaine peuvent provenir de diverses sources mais doivent remplir certains critères. Le modèle doit avoir un stratum corneum fonctionnel avec une couche sous-jacente de cellules vivantes. La fonction de barrière du stratum corneum doit être suffisante, ce qui peut être mis en évidence en démontrant la résistance du modèle à la cytotoxicité après l'application de substances connues pour leur cytotoxicité cellulaire mais qui ne traversent normalement pas le stratum corneum. Le modèle doit donner des résultats reproductibles dans des conditions expérimentales définies.

La viabilité des cellules vivantes dans le modèle doit être suffisante pour qu'il soit possible de faire la distinction entre les substances de contrôle positives et négatives. La viabilité cellulaire (par exemple, mesurée par le niveau de réduction du MTT, c'est-à-dire une valeur de DO) après l'exposition à la substance de contrôle négative doit se situer dans des limites acceptables pour le modèle en question. De même, les valeurs de viabilité cellulaire avec la substance de contrôle positive (par rapport à celles du contrôle négatif) doivent se situer dans des limites déterminées. Le plus important est que le modèle de prédiction utilisé doit être conforme aux normes de validation internationales.

1.7.2 Mode opératoire

1.7.2.1 Application du matériel d'essai

Pour les matières liquides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir la surface cutanée (25 µl/cm² au minimum). Pour les matières solides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir la peau et ensuite l'humidifier pour assurer un bon contact avec la peau; si nécessaire, les matières solides doivent être broyées en poudre avant leur application. La méthode d'application doit convenir à un large éventail de types de substances chimiques (voir référence 2, par exemple). À la fin de la période d'exposition, le matériel d'essai doit être enlevé soigneusement de la surface cutanée avec une solution saline.

1.7.2.2 Mesures de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules peut être mesurée à l'aide de toute méthode quantitative validée. La méthode la plus fréquemment utilisée est la réduction du MTT, dont on a constaté l'exactitude et la reproductibilité des résultats dans différents laboratoires (2). Le disque cutané est placé dans une solution de MTT de 0,3 mg/ml à 20-28 °C pendant 3 heures. Après extraction du précipité bleu de formazan (extraction par solvant), on mesure la concentration de formazan en déterminant la DO à une longueur d'onde de 545 à 595 nm.

1.7.2.3 Informations complémentaires

Le modèle de peau utilisé ainsi que le protocole exact de la durée d'exposition et des procédures de lavage, etc. auront une grande influence sur les résultats des mesures de la viabilité cellulaire. Il est recommandé d'étalonner la méthodologie et le modèle de prédiction en testant une série de substances standard de référence choisies parmi les substances chimiques utilisées dans l'étude de validation du CEVMA (3). Il est essentiel de démontrer que la méthode utilisée est reproductible dans un même laboratoire et entre laboratoires pour un large éventail de substances chimiques, conformément aux normes internationales. La méthode doit au moins satisfaire aux critères de validité scientifique définis précédemment (2) et les résultats de cette étude de validation doivent être publiés dans une revue scientifique examinée par les pairs.

2. **DONNÉES**

2.1 **TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

2.1.1 **Essai RET sur peau de rat**

Les valeurs de résistance ($k\Omega$) pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence sont présentées sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés, les valeurs moyennes et la classification qui en est déduite.

2.1.2 **Essai sur modèle de peau humaine**

Les valeurs de DO et les pourcentages calculés de viabilité cellulaire pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence sont présentés sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés, les valeurs moyennes et la classification qui en est déduite.

2.2 **ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

2.2.1 **Essai RET sur peau de rat**

Si la valeur moyenne de la RET obtenue pour la substance d'essai est supérieure à 5 $k\Omega$, cette substance n'est pas corrosive. Si la valeur RET est inférieure ou égale à 5 $k\Omega$ et la substance d'essai n'est pas une substance tensio-active ou une substance organique neutre, cette substance est corrosive.

Dans le cas des substances tensio-actives ou des substances organiques neutres dont la valeur RET est inférieure ou égale à 5 $k\Omega$, on peut évaluer la pénétration d'un colorant. Si la teneur moyenne en colorant du disque est supérieure ou égale à la teneur moyenne en colorant du disque du contrôle positif à 36 % de HCl obtenue concomitamment, la substance d'essai est un vrai positif et est donc corrosive. Si la teneur moyenne en colorant du disque est inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque du contrôle positif à 36 % de HCl obtenue concomitamment, la substance d'essai est un faux positif et est donc non corrosive.

2.2.2 **Essai sur modèle de peau humaine**

La valeur de la DO du contrôle négatif représente une viabilité cellulaire de 100 %; par conséquent, la valeur de la DO obtenue pour chaque échantillon d'essai peut être utilisée pour calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire qui établit la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre différentes classes de substances corrosives) doit être clairement définie dans le modèle de prédiction avant la validation de la méthode et l'étude de validation doit ensuite montrer que la valeur seuil est appropriée (voir référence 2, par exemple).

3. **RAPPORTS**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes.

Substance d'essai:

- données d'identification, nature physique et, si nécessaire, propriétés physicochimiques. Le cas échéant, des informations analogues doivent être fournies pour les substances de référence.

Conditions d'essai:

- détails du mode opératoire;
- description et justification de toute modification.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des valeurs de résistance (essai RET) ou des pourcentages de viabilité cellulaire (essai sur modèle de peau humaine) pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence, y compris les données des essais répétés et les valeurs moyennes;
- description de tout autre effet observé.

Discussion des résultats.

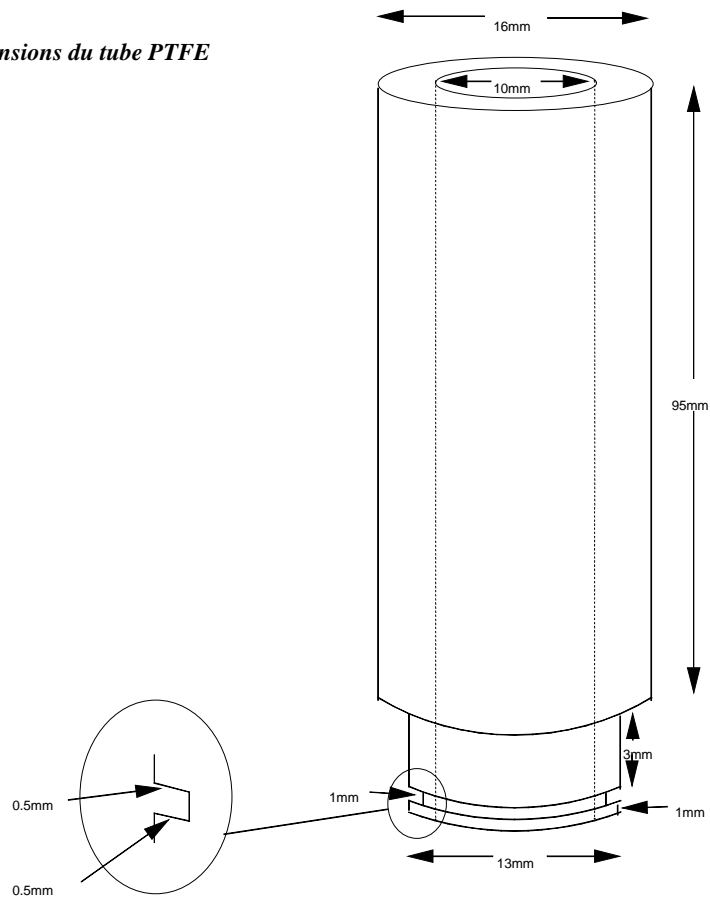
Conclusions

4. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* **12**, 483-524.
3. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro* **12**, 471-482.
4. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test - modifications and validation. *Food & Chemical Toxicology* **24**, 507-512.
5. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* **6**, 191-194.
6. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998). An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
7. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219-255.

Figure 1

Dimensions du tube PTFE



Dimensions des électrodes

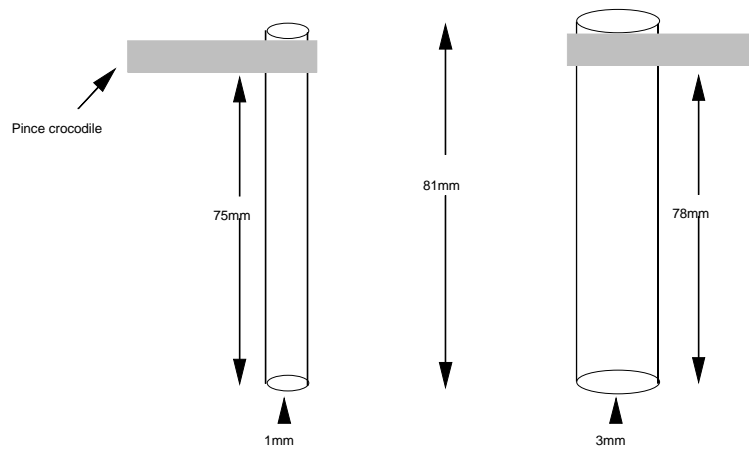
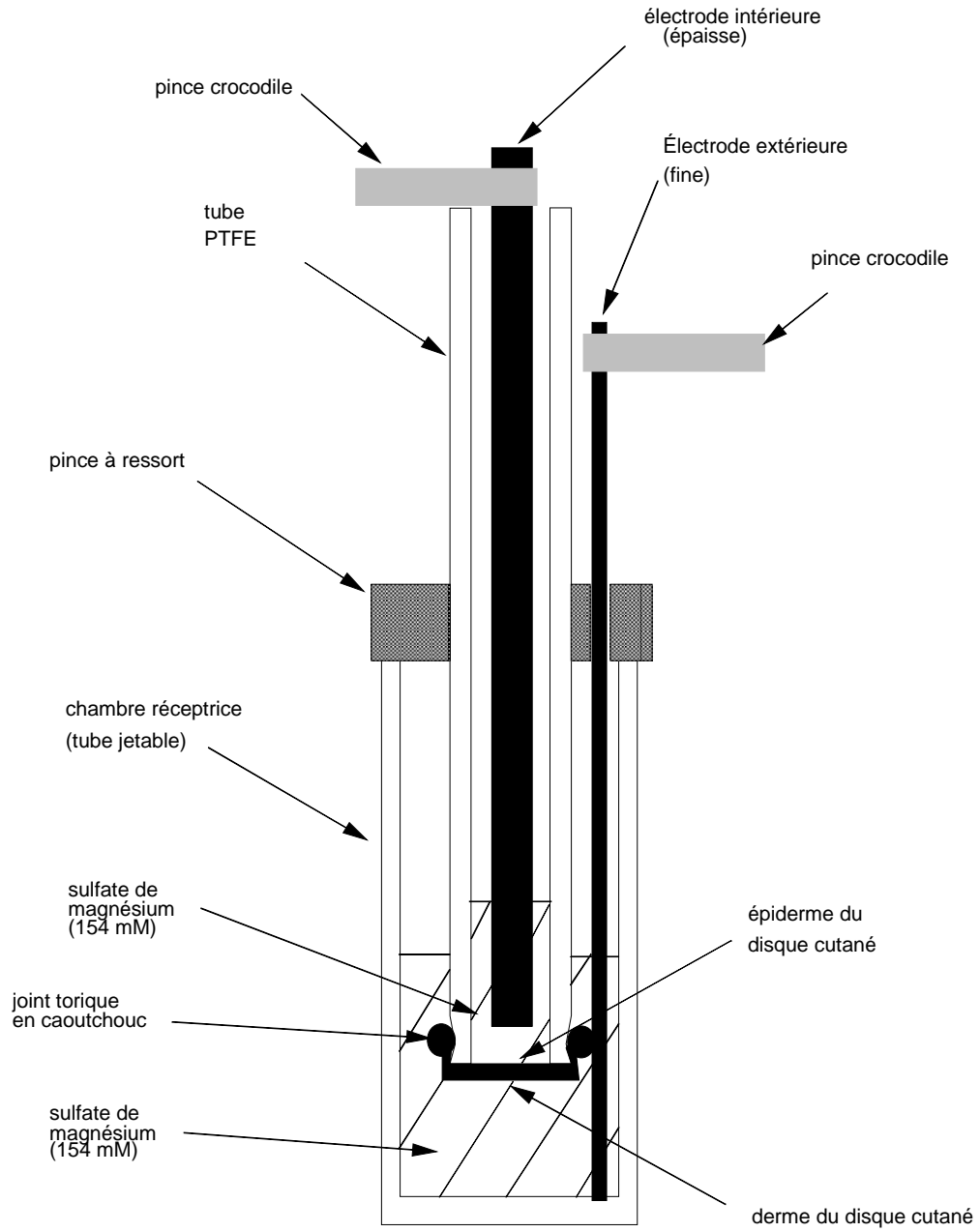


Figure 2

Appareillage pour l'essai RET sur peau de rat



B. 41. PHOTOTOXICITE - ESSAI DE PHOTOTOXICITE *IN VITRO* 3T3 NRU

1. METHODE

1.1 INTRODUCTION

La phototoxicité est définie comme une réaction toxique déclenchée par une première exposition de la peau à certains produits chimiques, suivie d'une exposition à la lumière, ou bien par l'irradiation de la peau après administration d'un produit chimique par voie systémique.

Les informations fournies par le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU permettent de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai, c'est-à-dire les dangers qu'elle est susceptible de présenter (ou son absence de dangers) en cas d'exposition au rayonnement UV et à la lumière visible.

Dans la mesure où la finalité toxicologique du test *in vitro* est de déterminer la *photocytotoxicité* induite par l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, les composés qui se révèlent phototoxiques *in vivo* après administration systémique et diffusion dans la peau, ainsi que les composés qui ont une action photo-irritante après application topique sur la peau peuvent être détectés par ce test.

Le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU a été élaboré et validé dans le cadre d'un projet conjoint UE/COLIPA entre 1992 et 1997 (1)(2)(3), visant à trouver une méthode *in vitro* valable pour remplacer les divers tests *in vivo* utilisés. En 1996, l'OCDE avait recommandé, à l'issue d'un atelier, une approche séquentielle *in vitro* pour l'évaluation de la toxicité (4).

Les résultats du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ont été comparés aux effets de phototoxicité/photo-irritation aiguë *in vivo* chez les animaux et chez les humains, et le test s'est révélé extrêmement fiable pour la prévision de ces effets. Le test n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la *photogénotoxicité*, la *photo-allergie*, et la *photocancérogénicité*, mais de nombreux produits chimiques qui possèdent ces propriétés spécifiques donneront des résultats positifs au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. Par ailleurs, le test ne permet pas non plus d'évaluer le *pouvoir phototoxique*.

L'annexe 1 propose une approche séquentielle pour les essais visant à déterminer la phototoxicité des produits chimiques.

1.2 DEFINITIONS

Irradiance: l'intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m² ou en mW/cm².

Dose de lumière : la quantité (= intensité × temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= W × s) par unité de surface, par ex. J/m² ou J/cm².

Bandes de longueurs d'ondes de la lumière UV : Les désignations recommandées par la CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) sont : UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) et UVC (100-280nm). D'autres désignations sont également utilisées : la division entre UVB et UVA est souvent placée à 320nm, et les UVA peuvent être subdivisés en UV-A1 et UV-A2 avec division à environ 340nm.

Viabilité cellulaire : paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par ex. fixation du colorant vital rouge neutre dans les lysosomes cellulaires), qui, en fonction de l'effet mesuré et du type de test utilisé, correspond au nombre total et/ou à la vitalité des cellules.

Viabilité cellulaire relative : viabilité cellulaire exprimée par rapport aux témoins négatifs (solvant) qui ont été prélevés tout ou long de la procédure (soit +UV soit -UV), mais non traités par un produit chimique.

Modèle prédictif : algorithme utilisé pour transformer les résultats d'un test de toxicité en une prévision du potentiel toxique. Dans les présentes lignes directrices d'essai, le PIF et le MPE peuvent être utilisés pour transformer les résultats du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU en une prévision du potentiel phototoxique.

PIF (Photo Irritation Factor - Facteur de photo-irritation): facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (EC_{50}) de la substance chimique d'essai, obtenues en présence (+UV) et en absence (-UV) d'une irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

MPE (Mean Photo Effect - Photo-effet moyen) : nouvelle mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé complet de deux courbes concentration-réponse obtenues avec (+UV) ou sans (-UV) irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

Phototoxicité : réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit chimique.

Photo-irritation: terme désignant une sous-catégorie de "phototoxicité", utilisé pour décrire uniquement les réactions phototoxiques qui se manifestent au niveau de la peau après exposition (par voie topique ou orale) à des produits chimiques. Ces réactions phototoxiques entraînent toujours des dommages cellulaires non spécifiques (réactions de type coup de soleil).

Photo-allergie : réactivité immunologique acquise qui ne se manifeste pas lors de la première exposition à la lumière et au produit chimique et nécessite une période d'induction d'une ou deux semaines avant que la réactivité cutanée puisse être mise en évidence.

Photogénotoxicité : réaction génotoxique observée pour un paramètre génétique, qui apparaît après exposition des cellules à une dose non génotoxique de lumière UV/visible et à un produit chimique non génotoxique.

Photocancérogénicité : cancérogénicité induite par une exposition répétée à la lumière et à un produit chimique. Le terme "photocancérogénicité" s'emploie lorsque l'effet tumorigène induit par les UV est accentué par l'exposition à un produit chimique.

1.3 SUBSTANCES DE REFERENCE

Outre la substance chimique *chlorpromazine* servant de témoin positif qui doit être testée concurremment dans chaque cas, il est recommandé d'utiliser comme substances de référence pour le test de phototoxicité 3T3 NRU un sous-ensemble des produits chimiques utilisés pour ce test lors des essais interlaboratoires (1)(3)(13).

1.4 REMARQUES INITIALES

Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (5)(6)(7)(8). Le seul point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans le domaine de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grothaus-Draper) la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique selon les présentes lignes directrices, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester. (par ex. suivant les lignes directrices d'essai 101 de l'OCDE). Si le coefficient d'extinction/d'absorbance molaire est inférieur à $10 \text{ litre} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (annexe 1).

1.5 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Quatre mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer comment l'absorption de lumière par un chromophore (chimique) peut entraîner une réaction phototoxique (7). Tous ces mécanismes entraînent des dommages cellulaires. Par conséquent, le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'un produit chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique d'UVA/lumière visible. Dans ce test, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre (Neutral Red - NR (9)) 24 heures après traitement par le produit chimique à tester et irradiation.

Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 h jusqu'à obtention de monocouches. Pour chaque produit chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 h avec huit concentrations distinctes du produit chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à une dose d'UVA/lumière visible non cytotoxique de 5 J/cm² UVA (expérience +UV), tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité (expérience -UV). Dans les deux plaques, le milieu de traitement est ensuite remplacé par un milieu de culture et, après une nouvelle période d'incubation de 24 h, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake - NRU) pendant 3 h. La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins négatifs non traités, est calculée pour chacune des huit concentrations d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence (+UV) et en absence (-UV) d'irradiation sont comparées, généralement au niveau EC₅₀, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 % par rapport aux témoins non traités.

1.6 CRITERES DE QUALITE

Sensibilité des cellules aux UVA, données historiques : la sensibilité des cellules aux UVA doit être régulièrement contrôlée. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU; elles sont irradiées le jour suivant par des doses d'UVA allant de 1 à 9 J/cm², et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Les cellules répondent aux critères de qualité si leur viabilité après irradiation par 5 J/cm² UVA est supérieure ou égale à 80% de la viabilité des témoins maintenus à l'obscurité. À la dose la plus forte de 9 J/cm² UVA, la viabilité doit être au moins égale à 50% de celle des témoins conservés à l'obscurité. Ce contrôle doit être répété tous les 10 passages de cellules environ.

Sensibilité aux UVA des cellules constituant les témoins négatifs, dans le test en cours : le test répond aux critères de qualité si les témoins négatifs (cellules dans une solution saline équilibrée de Earl - Earl's Balanced Salt Solution (EBSS)) avec ou sans 1% de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou 1% d'éthanol (EtOH)) dans l'expérience +UVA ont une viabilité supérieure ou égale à 80% de celle des cellules non irradiées dans le même solvant dans l'expérience menée en parallèle dans l'obscurité (-UVA).

Viabilité des témoins négatifs : la densité optique absolue (OD_{540 NRU}), mesurée dans l'extrait NR, des témoins négatifs indique si les 1×10⁴ cellules mises en culture par puit se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours d'essai. Un test répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne OD_{540 NRU} des témoins non traités est ≥ 0,2

Témoin positif : pour chaque test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurrentement. La chlorpromazine (CPZ) a été utilisée comme témoin positif dans l'étude de validation UE/COLIPA et est donc recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test *in vitro* 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis : *CPZ irradiée (+UVA)*: EC₅₀= 0,1 à 2,0 µg/ml, *CPZ non-irradiée (-UVA)*: EC₅₀ = 7,0 à 90,0 µg/ml. Le facteur de photo-irritation (PIF), c'est-à-dire la variation de l'EC₅₀ doit être d'au moins 6.

À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques connus, convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité du produit chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles. Dans ce cas, en fonction des données historiques, les plages de valeurs de la EC₅₀ et le PIF ou le MPE (Mean Photo Effect - photo-effet moyen) doivent être correctement définis en tant que critères d'acceptation du test.

1.7 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.7.1 Préparations

1.7.1.1 Cellules

Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris - Balb/c 3T3, clone 31 - provenant de ATCC ou de ECACC a été utilisée dans l'étude de validation et est donc recommandée. D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi donner de bons résultats avec le même protocole d'essai si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules; il convient toutefois de démontrer l'équivalence.

Les cellules doivent être régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si les résultats du contrôle sont satisfaisants.

Dans la mesure où la sensibilité aux UVA des cellules peut augmenter avec le nombre de passages, il convient d'utiliser des cellules Balb/c 3T3 ayant subi le moins de passages possibles, de préférence moins de 100. Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UVA des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle de la qualité décrite dans les présentes lignes directrices.

1.7.1.2 *Milieux et conditions de culture*

Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés doivent être utilisés pour le passage systématique des cellules et pendant la procédure d'essai. Pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM enrichi avec 10% de sérum de veau nouveau-né, 4 mM de glutamine, pénicilline et streptomycine, et les conditions sont une incubation en atmosphère humidifiée à 37°C / 7,5% CO₂. Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales pour les cellules ou la lignée cellulaire utilisées.

1.7.1.3 *Préparation des cultures*

Des cellules provenant de cultures mères congelées sont mises en culture à une densité appropriée dans le milieu de culture, et sont repiquées au moins une fois avant d'être utilisées pour le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU.

Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture estensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 h après la mise en culture des cellules. Pour les cellules Balb/c 3T3 cultivées sur des plaques à 96 puits, la densité cellulaire recommandée est de 1×10^4 cellules par puit.

Pour chaque produit chimique testé, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées en même temps pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+UVA/lumière visible) et l'autre maintenue à l'obscurité (-UVA/lumière visible).

1.7.1.4 *Activation métabolique*

Alors que l'utilisation de systèmes d'activation métabolique est nécessaire en règle générale pour tous les tests *in vitro* de prédiction du potentiel génotoxique ou cancérigène, dans le cas de la phototoxicologie, on ne connaît pas jusqu'à présent de produit chimique qui nécessite une transformation métabolique pour agir comme une phototoxine *in vivo* ou *in vitro*. Par conséquent, il ne paraît pas utile ni scientifiquement fondé de réaliser le présent test en présence d'un système d'activation métabolique.

1.7.1.5 *Produit chimique à tester / Préparation*

Les produits chimiques à tester doivent être fraîchement préparés juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'ils sont conservables. Une préparation en lumière rouge peut s'avérer nécessaire lorsque qu'une photodégradation rapide est probable.

Les produits chimiques à tester doivent être dissous dans des solutions salines tamponnées, par ex. solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution - EBSS) ou solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline - PBS), qui doivent être exemptes de constituants protéiques et d'indicateurs pH colorés qui absorbent la lumière, afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation.

Les produits chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissous dans des solvants appropriés à 100 fois la concentration finale souhaitée, puis dilués à raison de 1:100 avec la solution saline tamponnée. Si un solvant est utilisé, il doit être présent au volume constant de 1% (v/v) dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs et dans toutes les concentrations du produit chimique à tester.

Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité (par ex. acétone) peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avec soin, notamment les possibilités de réaction avec le produit chimique à tester et d'atténuation de l'effet phototoxique, ainsi que les propriétés de fixation des radicaux.

Si nécessaire, on pourra recourir à un mélangeur à vortex et/ou à la sonication et/ou à un chauffage à 37°C pour faciliter la solubilisation.

1.7.1.6 Irradiation UV/Préparation

Source de lumière : le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés est le facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et de la lumière visible sont généralement associés à une photosensibilisation (7)(10), tandis que les UVB sont moins importants de ce point de vue, étant directement très cytotoxiques avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1000 entre 313 et 280 nm (11). Parmi les critères présidant au choix de la source de lumière appropriée, il est essentiel que la source de lumière émette des longueurs d'onde absorbées par le produit chimique à tester et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photosensibilisantes connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas être trop nuisibles pour le système d'essai, notamment en ce qui concerne l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

La lumière solaire simulée par les simulateurs solaires est considérée comme la source de lumière optimale. Les simulateurs solaires utilisent des arcs au xénon ainsi que des arcs mercure (dopé)- halogénures de métaux. Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils ne reproduisent pas parfaitement la lumière solaire. Dans la mesure où tous les simulateurs solaires émettent d'importantes quantités d'UVB, ils doivent être équipés de filtres adéquats pour atténuer les longueurs d'onde UVB hautement cytotoxiques.

Pour l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU, il convient d'utiliser un spectre d'irradiance pratiquement exempt d'UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Un exemple de distribution de l'irradiance spectrale du simulateur solaire équipé de filtres, qui a été utilisé dans l'étude de validation du test *in vitro* 3T3 NRU a été publié (3).

Dosimétrie : l'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque test de phototoxicité à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié qui doit avoir été étalonné en fonction de la source. La performance du radiomètre UV doit être contrôlée. À cet effet, on recommande l'utilisation d'un second radiomètre UV de référence, du même type et étalonné de la même façon. Dans l'idéal, à intervalles plus grands, il conviendrait d'utiliser un spectroradiomètre pour mesurer l'irradiance spectrale de la source filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande, mais l'utilisation de tels instruments exige des opérateurs dûment qualifiés.

L'étude de validation a établi qu'une dose de 5 J/cm² (UVA) était non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter même les produits chimiques faiblement phototoxiques. Pour obtenir 5 J/cm² dans un délai de 50 min, l'irradiance doit être réglée à 1,666 mW/cm². En cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la dose d'UVA en respectant le critère selon lequel cette dose ne doit pas être nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour détecter les phototoxines standard. La durée de l'exposition à la lumière se calcule de la façon suivante :

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose d'irradiation (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiance (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 Conditions d'essai

La concentration maximale du produit chimique à tester ne doit pas dépasser 100 µg/ml, puisque tous les produits chimiques phototoxiques ont été détectés à des concentrations plus faibles, et qu'à des concentrations plus élevées, l'incidence des faux positifs augmente (surprédiction) (13). Le pH de la plus forte concentration du produit chimique à tester doit être satisfaisant (pH entre 6,5 et 7,8).

Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+UVA) et en absence (-UVA) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. La plage et les intervalles d'une série de concentrations doivent être ajustées de telle façon que les courbes concentration-réponse soient suffisamment confirmées par les données expérimentales. Il convient de recourir à une progression géométrique des concentrations (avec un facteur de dilution constant).

1.7.3 **Procédure d'essai¹**

1.7.3.1 *1^{er} jour*

Préparer une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml dans le milieu de culture, et verser 100 μ L de milieu de culture seul dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 μ L de la suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml (= 1×10^4 cellules/puit). Pour chaque produit chimique à tester, préparer deux plaques : une pour la détermination de la cytotoxicité (-UVA) et l'autre, pour la détermination de la phototoxicité (+UVA).

Incuber les cellules pendant 24 h (7,5% CO₂, 37°C) jusqu'à obtention d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

1.7.3.2 *2^e jour*

Après incubation, décanter le milieu de culture pour séparer les cellules et laver deux fois avec 150 μ L de EBSS/PBS par puit. Ajouter 100 μ L de EBSS/PBS contenant la concentration appropriée du produit chimique à tester ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes du produit chimique à tester. Incuber les cellules avec le produit chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (7,5% CO₂, 37°C).

Pour réaliser la partie (+UVA) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes à travers le couvercle de la plaque à 96 puits par une dose d'UVA de 1,7 mW/cm² (= 5 J/cm²). Ventilier avec un ventilateur pour éviter la condensation d'H₂O sous le couvercle. Conserver les plaques répliques (-UVA) à température ambiante dans une boîte sombre pendant 50 min (= durée de l'exposition aux UVA).

Décanter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 μ L de EBSS/PBS. Remplacer le EBSS/PBS par le milieu de culture et incuber (7,5% CO₂, 37 °C) jusqu'au lendemain (18-22 h).

1.7.3.3 *3^e jour*

Évaluation microscopique

Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter les changements morphologiques des cellules dus aux effets cytotoxiques du produit chimique testé. Ce contrôle est recommandé pour exclure les erreurs expérimentales, mais les observations ne sont pas utilisées pour l'évaluation de la cytotoxicité ou de la phototoxicité.

Test de fixation du rouge neutre

Laver les cellules avec 150 μ L de EBSS/PBS préchauffé. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 μ L de milieu NR et incuber à 37 °C en atmosphère humidifiée à 7,5% CO₂, pendant 3 h.

Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 μ L de EBSS/PBS. Décanter et absorber complètement le EBSS/PBS. (*facultatif*: centrifuger la plaque renversée.)

Ajouter exactement 150 μ L de solution de désorption du NR (solution d'éthanol/acide acétique fraîchement préparée).

Passer rapidement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes, jusqu'à ce qu'à ce que le NR soit extrait des cellules et ait formé une solution homogène.

Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540 nm dans un spectrophotomètre en utilisant les essais à blanc comme référence. Sauvegarder les données dans un format de fichier approprié (par ex. ASCII) en vue d'une analyse ultérieure.

¹ Des détails supplémentaires sont donnés par la référence (12).

2 DONNÉES

2.1 QUALITÉ ET QUANTITÉ DES DONNÉES

Les données doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-réponse obtenues avec et sans irradiation UVA/lumière visible. Si on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster à la fois la plage des concentrations et l'intervalle entre chaque concentration, afin qu'il y ait concordance entre la courbe et les données expérimentales. Étant donné qu'un produit chimique peut ne pas être cytotoxique jusqu'à la concentration limite définie de 100 µg/ml dans l'expérience à l'obscurité (-UVA), mais être très cytotoxique lorsqu'il est irradié (+UVA), il peut s'avérer utile de faire différer de plusieurs ordres de grandeur les plages de concentrations à tester dans les deux parties de l'expérience, afin de satisfaire à l'exigence de qualité des données. Si aucune cytotoxicité n'est constatée dans les deux parties de l'expérience (-UVA et +UVA), il suffit de réaliser l'essai avec un grand intervalle entre chaque dose jusqu'à la concentration maximale.

Il n'est pas nécessaire de procéder à une contre expérience pour vérifier un résultat clairement positif. Il n'est pas non plus nécessaire de vérifier les résultats clairement négatifs, à condition que le produit chimique ait été testé à des concentrations suffisamment élevées. Dans de tels cas, une expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des plages de concentrations est suffisante.

Les tests qui donnent des résultats limites, proches du seuil critique du modèle prédictif doivent être vérifiés par une contre-expérience.

Si une contre-expérience s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales afin d'obtenir un résultat bien net. Une des variables clés dans ce test est la préparation des solutions du produit chimique à tester. Aussi la variation de ces conditions (co-solvant, pulvérisation, sonication) peut-elle être essentielle dans la répétition d'un test. Une autre possibilité est de faire varier le temps de pré-incubation. Une réduction de cette durée peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

2.2 TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Si possible, on cherchera à déterminer la concentration du produit chimique à tester, qui entraîne une inhibition à 50% de la fixation du rouge neutre par les cellules (EC_{50}). Cela peut se faire en appliquant n'importe quelle méthode de régression non linéaire appropriée (de préférence une fonction de Hill ou une régression logistique) aux données de réponse aux concentrations, ou en utilisant d'autres méthodes d'ajustement (14). Avant d'utiliser une EC_{50} pour la suite des calculs, il convient de vérifier comme il se doit la qualité de l'ajustement. Une autre solution consiste à utiliser des méthodes d'ajustement graphique pour calculer l' EC_{50} . Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser du papier à échelle fonctionnelle (axe des x: log, axe des y: probit) car très souvent, la fonction concentration-réponse devient pratiquement linéaire après cette transformation.

2.3 ÉVALUATION DES RÉSULTATS (MODÈLES PRÉDICTIONNELS)

2.3.1 *Modèle prédictif version 1: facteur de photo-irritation (PIF)*

Si, tant en présence (+UVA) qu'en absence (-UVA) de lumière, on obtient des courbes concentration-réponse complètes, on calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante :

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un $PIF < 5$ indique une absence de potentiel phototoxique, alors qu'un $PIF \geq 5$ indique un potentiel phototoxique

Si un produit chimique est cytotoxique uniquement en présence de lumière (+UVA) et n'est pas cytotoxique dans les conditions -UVA, il n'est pas possible de calculer le PIF, bien que ce résultat indique un potentiel phototoxique. Dans un tel cas, on peut calculer un "> PIF" si le test de cytotoxicité (-UV) est réalisé jusqu'à la concentration d'essai la plus élevée (C_{max}); c'est cette dernière valeur qui est utilisée pour calculer le "> PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Si l'on ne peut obtenir qu'un "> PIF", alors toute valeur >1 indique un potentiel phototoxique.

Si l'on ne peut calculer ni la EC₅₀ (-UV) ni la EC₅₀ (+UV) parce que le produit chimique ne fait preuve d'aucune cytotoxicité jusqu'à la concentration d'essai la plus forte, cela démontre une absence de potentiel phototoxique. Dans ce cas, on utilise un "PIF = *1" théorique pour caractériser ce résultat.

$$(c) \quad \text{PIF} = *1 = \frac{C_{\max}(-UV)}{C_{\max}(+UV)}$$

Si l'on ne peut obtenir qu'un "PIF = *1", cela signifie qu'il n'y a pas de potentiel phototoxique.

Dans les cas (b) et (c), les concentrations atteintes dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU doivent être soigneusement prises en considération lors de la détermination du potentiel phototoxique.

2.3.2 *Modèle prédictif version 2: photo-effet moyen (MPE)*

À titre de variante, on peut utiliser une nouvelle version du modèle de prédiction du potentiel phototoxique, qui a été mise au point à partir des données de l'étude de validation UE/COLIPA (15) et testée en aveugle dans une étude subséquente portant sur la phototoxicité *in vitro* des substances chimiques utilisées comme filtres UV (13). Ce modèle permet de s'affranchir des limites inhérentes au modèle PIF dans les cas où l'on ne peut obtenir une EC₅₀. Ce modèle utilise le photo-effet moyen ("Mean Photo Effect" (MPE)) qui est une mesure basée sur une comparaison des courbes concentration-réponse complètes. Pour utiliser le modèle MPE, l'université Humboldt (Berlin, Allemagne) a mis au point un logiciel spécial qui peut être obtenu gratuitement.

2.4 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un résultat positif au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (PIF ≥ 5 ou MPE ≥ 0,1) indique que la substance testée a un potentiel phototoxique. Si ce résultat est obtenu à des concentrations inférieures à 10 µg/ml, le produit chimique est aussi susceptible d'agir comme une phototoxine dans diverses conditions d'exposition *in vivo*. Si un résultat positif n'est obtenu qu'à la concentration d'essai maximale de 100 µg/mL, d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques ou le pouvoir phototoxique. Il peut s'agir notamment d'étudier la pénétration et l'absorption cutanées ou l'éventuelle accumulation du produit chimique dans la peau, ou de soumettre le produit à un autre type de test pour confirmer les résultats, en utilisant par exemple un modèle de peau humaine *in vitro*.

Un résultat négatif au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 or MPE < 0,1) indique que la substance testée ne s'est pas révélée phototoxique pour les cellules de mammifère en culture dans les conditions utilisées. Dans les cas où le produit chimique a pu être testé jusqu'à la concentration maximale de 100 µg/ml, un résultat négatif indique que le produit chimique n'a pas de potentiel phototoxique et qu'une phototoxicité *in vivo* peut être considérée comme improbable. Dans les cas où l'on a obtenu des réponses toxiques identiques (EC₅₀+UV et EC₅₀-UV) à des concentrations plus faibles, l'interprétation des résultats sera la même. En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+UV et -UV) et si la solubilité du produit dans l'eau a limité les concentrations à des valeurs inférieures à 100 µg/ml, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un test de confirmation (par exemple, un test sur un modèle de peau *in vitro* ou *ex vivo*, ou bien un test *in vivo*).

3 COMMUNICATION DES RÉSULTATS RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Produit chimique à tester :

- Données d'identification et n° CAS si connu
- Nature physique et pureté
- Propriétés physicochimiques importantes pour la réalisation de l'étude
- Stabilité et photostabilité si connues

Solvant:

- justification du choix du solvant
- solubilité du produit chimique à tester dans ce solvant
- pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement (EBSS ou PBS)

Cellules:

- type et provenance des cellules
- absence of mycoplasmes
- nombre de passages cellulaires, si connu
- sensibilité des cellules aux UVA, déterminée avec l'équipement d'irradiation utilisé dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU

Conditions d'essai (a); *incubation avant et après traitement*:

- type et composition du milieu de culture
- conditions d'incubation (concentration de CO₂, température, humidité)
- durée de l'incubation (avant traitement et après traitement)

Conditions d'essai (b); *traitement par le produit chimique* :

- justification des concentrations du produit chimique utilisées en présence et en absence de rayonnement UV/lumière visible
- en cas de solubilité limitée du produit chimique et d'absence de cytotoxicité, justification de la concentration maximale utilisée
- type et composition du milieu de traitement (solution saline tamponnée)
- durée du traitement chimique

Conditions d'essai (c) : *irradiation*:

- justification de la source de lumière utilisée
- caractéristiques d'irradiance spectrale de la source de lumière
- caractéristiques de transmission / absorption du(des) filtre(s) utilisé(s)
- caractéristiques du radiomètre et modalités d'étalonnage
- distance entre la source de lumière et le système d'essai
- irradiance UVA à cette distance, exprimée en mW/cm²
- durée de l'exposition UV/lumière visible
- dose d'UVA (irradiance × temps), exprimée en J/cm²
- température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité

Conditions d'essai (d); *test NRU*

- composition du milieu NR
- durée de l'incubation dans NR
- conditions d'incubation (concentration de CO₂, température, humidité)
- conditions d'extraction du NR (agent d'extraction, durée)
- longueur d'ondes utilisée pour la lecture spectrophotométrique de la densité optique du NR
- seconde longueur d'ondes (référence), le cas échéant
- contenu de l'échantillon destiné à l'essai à blanc du spectrophotomètre, le cas échéant

Résultats

- viabilité cellulaire obtenue pour chaque concentration du produit chimique à tester, exprimée en % de la viabilité moyenne des témoins
- courbes concentration - réponse (concentration du produit chimique - viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +UVA et -UVA parallèles.
- analyse des données fournies par les courbes concentration-réponse : si possible, calcul / détermination des EC₅₀ (+UVA) et EC₅₀ (-UVA)
- comparaison des deux courbes concentration-réponse obtenues en présence et en absence de rayonnement UVA/lumière visible, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE)
- classification du potentiel phototoxique
- critères d'acceptation de l'essai (a), *témoin négatif simultané* :
 - viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées
 - données historiques sur le témoin négatif, écart moyen et écart-type
- critères d'acceptation de l'essai (b), *témoin positif simultané* :
 - EC₅₀(+UVA) et EC₅₀(-UVA) et PIF du produit chimique témoin positif
 - données historiques sur le produit chimique témoin positif : EC₅₀(+UVA) et EC₅₀(-UVA) et PIF, écart moyen et écart-type

Discussion des résultats

Conclusions

1. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* **8**, 793-796.
2. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA **26**, 7-8.
3. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W and Brantom, P. (1998) EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* **12**, 305-327.
4. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - *OECD Publications Office*, Paris, 1996.
5. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxicology in Vitro* **7**, 95-102.
6. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research progress in organic, biological and medicinal chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapura, O. and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, 314-348.
8. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology"; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.
9. Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119-124.
10. Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology"; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515-530.
11. Tyrrell R. M. and Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Research* **47**, 1825-1829.
12. ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
13. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998). A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA **26**, 679-708.
14. Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, 127-138.
15. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA **25**, 445-462.

ANNEXE 1

Rôle du test de phototoxicité 3T3 NRU dans une approche séquentielle des essais de phototoxicité des produits chimiques

