



Document d'orientation #02

Essais de toxicité orale subchronique chez les animaux de laboratoire

Mars 2019

Étape 7: Approbation du Comité Directeur

# ESSAIS DE TOXICITÉ ORALE SUBCHRONIQUE CHEZ LES ANIMAUX DE LABORATOIRE

Approuvé par le Comité Directeur en  
mars 2019

*Les entreprises qui souhaitent présenter une demande ou un dossier aux fins d'approbation préalable à la mise en marché devraient contacter les instances réglementaires des pays concernés afin de confirmer que ceux-ci acceptent les dispositions du présent document.*

*La Coopération Internationale pour la Convergence des Exigences Techniques s'appliquant à l'Évaluation des Ingrédients d'Aliments pour Animaux (International Cooperation for Convergence of Technical Requirements for the Assessment of Feed Ingredients – ICCF) a été créée en 2017 dans le but d'établir des documents d'orientation communs proposant des recommandations techniques pour l'évaluation des ingrédients d'aliments pour animaux entrant dans la composition des aliments pour animaux ainsi que de nouveaux usages destinés à des ingrédients d'aliments pour animaux existants.*

**Le présent document a été élaboré par un groupe d'experts de l'ICCF et a fait l'objet de consultations menées par les parties prenantes, conformément au processus de l'ICCF.**

*Les membres fondateurs de l'ICCF sont notamment l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA), la Commission Européenne (DG Santé), la Food and Drug Administration des États Unis (FDA) ainsi que l'American Feed Industry Association (AFIA), l'Association de Nutrition Animale du Canada (ANAC), l'EU Association of Specialty Feed Ingredients and their Mixtures (FEFANA) et l'International Feed Industry Federation (IFIF).*

Secretariat: c/o IFIF, P.O. Box 1340 – 51657 Wiehl (Germany) – [secretariat@iccffeed.org](mailto:secretariat@iccffeed.org)

## **Table des matières**

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
1.1 Objet .....	4
1.2 Considérations initiales .....	4
1.3 Définitions .....	6
<b>2. PRINCIPES GÉNÉRAUX.....</b>	<b>6</b>
<b>3. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE .....</b>	<b>7</b>
3.1 Sélection des animaux de laboratoire .....	7
3.2 Conditions de logement et d'alimentation.....	7
3.3 Préparation des animaux.....	9
3.4 Préparation des doses .....	10
<b>4. PROCÉDURE .....</b>	<b>12</b>
4.1 Placement des animaux.....	12
4.2 Nombre et sexe des animaux d'essai .....	13
4.3 Dosage.....	13
4.4 Observations .....	17
4.5 Hématologie et biochimie clinique .....	20
<b>5. PATHOLOGIE.....</b>	<b>24</b>
5.1 Nécropsie macroscopique.....	24
5.2 Poids des organes .....	25
5.3 Pathologie de la reproduction .....	26
5.4 Préparation des tissus aux fins d'examen histopathologique.....	26
5.5 Histopathologie .....	28
5.6 Détection de l'activité endocrinienne .....	28
<b>6. DONNÉES ET RAPPORT .....</b>	<b>30</b>

<b>7. RAPPORT D'ESSAI .....</b>	<b>31</b>
<b>8. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>34</b>
8.1 Codex Alimentarius .....	34
8.2 OCDE .....	34
8.3 VICH .....	34
8.4 États-Unis .....	35
8.5 Union européenne.....	35
8.6 Autres.....	36
<b>9. ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>37</b>

## ESSAI DE TOXICITÉ ORALE SUBCHRONIQUE CHEZ LES ANIMAUX DE LABORATOIRE

### 1. INTRODUCTION

#### 1.1 OBJET

Lorsqu'il est question d'évaluer et de mesurer les caractéristiques potentiellement toxiques des ingrédients d'aliments pour animaux, les études de toxicité orale subchronique chez les rongeurs se déroulent normalement sur une période de 90 jours (trois mois). Ces études fournissent des renseignements quant aux effets possibles sur la santé des animaux par suite d'une exposition répétée pendant la période qui couvre le développement post sevrage et la croissance jusqu'à l'âge adulte.

Le présent document présente des lignes directrices pour l'élaboration d'un protocole d'essai de toxicité orale subchronique visant à évaluer les risques que représentent les ingrédients des aliments pour animaux. Il a été conçu avec le concours d'une équipe d'experts internationaux et tient compte des meilleures pratiques menant à l'obtention de résultats probants.

Quoique les présentes lignes directrices aident à assurer l'acceptabilité du protocole d'essai, les demandeurs devraient toujours consulter les instances réglementaires concernées ou les directives applicables lors de l'étape de développement d'un nouvel ingrédient d'aliment pour animaux ou avant de prévoir un nouvel usage pour un ingrédient autorisé afin de déterminer si une étude de toxicité est requise dans le cadre de l'évaluation préalable à la mise en marché.

#### 1.2 CONSIDÉRATIONS INITIALES

Les présentes lignes directrices ont été élaborées après un examen des pratiques d'évaluation de la sécurité sanitaire<sup>1</sup> des aliments pour animaux en vigueur aux États Unis (É. U.), dans l'Union européenne (UE) et au Canada. Ce document est le premier d'une série conçue pour faciliter l'acceptation mutuelle des données nécessaires à l'évaluation de la sécurité sanitaire des

---

<sup>1</sup> Synonymes utilisés dans d'autre contexte : salubrité, innocuité

aliments pour animaux. L'harmonisation des exigences réglementaires à cet effet vise à éviter des essais inutiles et redondants sur les animaux. Les directives nationales et internationales suivantes ont été passées en revue afin d'en tirer les meilleures pratiques :

- OCDE : Essai n° 408 : Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours sur les rongeurs [2]
- VICH : Études pour l'évaluation de l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires dans l'alimentation humaine: approche Générale pour les tests [8]
- VICH : Études pour l'évaluation de l'innocuité des résidus de médicaments vétérinaires dans l'alimentation humaine: Test de toxicité de doses répétées (90 jours) [9]
- FDA des É.-U. : Livre rouge 2000, Chapitre iv.C.4.A, Étude de toxicité subchronique chez les rongeurs [10]
- EPA des É.-U. : OPPTS 870.3100 Lignes Directrices sur les Effets sur la Santé – toxicité sur 90 jours chez les rongeurs [11]
- EFSA : Document d'orientation sur la conduite de tests à doses répétées sur 90 jours par voie orale chez les rongeurs pour les aliments pour animaux et autres documents connexes [12, 13, 14]

Avant d'entamer l'étude de toxicité présentée dans ce document, il convient d'analyser les lacunes que présentent les données toxicologiques existantes afin de générer des données qui combleront les écarts relevés. Les essais réalisés devraient fournir suffisamment de données toxicologiques pour garantir la protection de la santé des animaux et la sécurité sanitaire des aliments, tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse et la conservation des ressources. Dans tous les cas, le nombre d'animaux utilisés doit être justifiable du point de vue scientifique et tenir compte des principes des trois R – remplacement, réduction et raffinement – en matière d'essais sur les animaux.

Lors de la conception et de l'exécution de l'étude, il convient de tenir compte du bien-être des animaux de laboratoire utilisés. L'utilisation de tels animaux doit être conforme aux protocoles décrits ci-après ainsi qu'aux normes générales d'éthique et aux normes nationales encadrant l'utilisation et le soin des animaux de laboratoire.

Il faut souligner qu'il peut y avoir une obligation dans certaines juridictions pour que cette étude soit menée conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Le demandeur doit être informé d'une telle exigence, le cas échéant.

## 1.3 DÉFINITIONS

**Aliments pour animaux** : Tout produit composé d'un ou de plusieurs ingrédients d'aliment pour animaux, transformé, semi-transformé ou brut destiné à l'alimentation directe des animaux.

**Ingrédient d'aliments pour animaux** : Élément constituant de toute combinaison ou de tout mélange destiné à l'alimentation animale, qu'il ait ou non une valeur nutritionnelle dans le régime alimentaire de l'animal. Les ingrédients d'aliments pour animaux peuvent être d'origine végétale, animale, microbienne ou aquatique ou être d'autres substances organiques ou inorganiques.

## 2. PRINCIPES GÉNÉRAUX

L'essai de toxicité décrit ci-après vise à recueillir des données sur les principaux effets toxiques d'un ingrédient d'aliments pour animaux, à déterminer les organes cibles de la toxicité et la possibilité d'accumulation, en plus de donner une estimation de la dose sans effet nocif observé (DSENO). Ces données peuvent servir à :

1. Établir les doses appropriées pour les études ultérieures à plus long terme chez les rongeurs (études de toxicité chronique ou de cancérogénicité) ou d'autres études spécialisées qui évaluent plus en détails la toxicité éventuelle sur des organes cibles, notamment la neurotoxicité, l'immunotoxicité et l'activité endocrinienne, ou encore sur le développement et la reproduction.
2. Extrapoler les doses appropriées pour des essais sur des non-rongeurs, y compris différentes espèces d'animaux de laboratoire (p. ex., les chiens ou les porcs miniatures), ou des espèces cibles particulières (p. ex., les oiseaux, les bovins, les porcs) dans le cadre d'une évaluation globale des risques.
3. Évaluer les risques pour la santé humaine que représentent les métabolites provenant d'ingrédients d'aliments pour animaux qui pourraient se retrouver dans les produits issus d'animaux destinés à l'alimentation humaine (c.-à-d. la viande, le lait et les œufs).

### **3. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

#### **3.1 SÉLECTION DES ANIMAUX DE LABORATOIRE**

Le présent document s'applique aux essais menés sur des rongeurs. Bien qu'une variété d'espèces de rongeurs puisse être utilisée, le rat demeure l'espèce préférée, plus particulièrement les jeunes mâles et les jeunes femelles adultes en bonne santé issus de lignées élevées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gestantes.

##### **3.1.1 Lignées**

Lors de la sélection d'une espèce, d'une lignée ou d'une sous-lignée de rongeurs aux fins d'essais de toxicité, il importe de tenir compte de la sensibilité générale des animaux d'essai et de la réactivité d'organes et tissus particuliers aux substances chimiques toxiques. Le choix de lignées de rongeurs endogames, exogames ou hybrides à utiliser doit reposer sur les questions scientifiques à résoudre. De plus, il importe que les animaux d'essai proviennent d'élevages sains et bien caractérisés. Comme certaines lignées de rats présentent de faibles capacités de survie, la durée de vie des animaux d'essai choisis doit correspondre au moins à la durée recommandée de l'étude. S'il s'agit d'essais préliminaires s'inscrivant dans le cadre d'une étude à long terme sur la toxicité chronique, les animaux utilisés pour les deux études doivent provenir d'une même lignée et d'une même source.

##### **3.1.2 Âge des animaux d'essai**

L'administration du traitement doit commencer dès que possible après le sevrage et l'acclimatation des animaux, au plus tôt six semaines suivant la naissance, mais avant l'âge de neuf semaines.

#### **3.2 CONDITIONS DE LOGEMENT ET D'ALIMENTATION**

##### **3.2.1 Logement**

Les animaux doivent être logés en paires ou en petits groupes du même sexe. S'il est scientifiquement justifié de le faire, ils peuvent aussi être logés individuellement, bien que la période de logement individuel doive se limiter à la période minimale requise aux fins de l'étude.

Il faut parfois surveiller plus fréquemment les animaux logés en groupe afin de prévenir la perte d'organes et de tissus chez les animaux moribonds et morts pour cause de cannibalisme.

### **3.2.2 Litière**

Il convient de prendre toutes les précautions qui s'imposent pour éviter d'utiliser des aliments ou de la litière pour animaux, qui peuvent contenir des concentrations inacceptables de substances ayant une activité hormonale susceptible de brouiller l'interprétation des résultats (p. ex., la présence de phytoestrogènes).

### **3.2.3 Température**

La température de la salle où sont gardés les animaux d'essai doit être maintenue à  $22 \pm 3$  °C ( $72 \pm 5$  °F).

### **3.2.4 Humidité**

L'humidité relative doit être d'au moins 30 %, et de préférence ne pas dépasser 70 % ( $50 \pm 20$  %).

### **3.2.5 Éclairage**

L'éclairage doit provenir d'une source artificielle et suivre une séquence de 12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité.

### **3.2.6 Alimentation**

De façon générale, les animaux utilisés dans les essais de toxicité ont un accès illimité aux aliments et à l'eau. Les animaux témoins et les animaux d'essai doivent recevoir des aliments provenant d'un même lot de production. Ces aliments doivent être analysés pour confirmer qu'ils couvrent les besoins nutritionnels de l'espèce utilisée et pour y détecter la présence d'impuretés qui pourraient influencer le résultat de l'essai. Dans le cadre d'études sur l'alimentation, les régimes conventionnels de laboratoire doivent être utilisés avec un approvisionnement illimité en eau potable.

À moins que des circonstances particulières ne justifient une autre approche, il faut veiller à ce que les aliments servis aux groupes d'animaux traités avec la substance à tester soient iso



caloriques (équivalents en densité calorique) et contiennent les mêmes teneurs en éléments nutritifs (p. ex., fibres, micronutriments) que ceux servis au groupe témoin. La présence de variables alimentaires inconnues ou mal contrôlées peut entraîner des déséquilibres nutritionnels ou une privation calorique susceptible de brouiller l'interprétation des résultats de l'étude de toxicité (p. ex., la durée de vie, l'incidence de base des tumeurs), en plus d'altérer le résultat et la reproductibilité des études. Si la substance à tester est administrée par voie alimentaire, elle doit être bien mélangée à la ration servie, ce qui peut influencer le choix de cette dernière.

La présence de concentrations élevées de phytoestrogènes dans les aliments pour animaux de laboratoire est connue pour augmenter le poids utérin des rongeurs. À titre indicatif, la concentration de phytoestrogènes dans les aliments des rongeurs de laboratoire ne doit pas devrait pas dépasser 350 µg d'équivalents génistéine par gramme.

### **3.3 PRÉPARATION DES ANIMAUX**

#### **3.3.1 Identification des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux en bonne santé qui n'ont jamais fait l'objet de procédures expérimentales. L'espèce, la lignée et, s'il y a lieu, la sous-lignée de chaque animal, sa provenance, son sexe, son âge et son poids doivent être dûment consignés. Les animaux doivent avoir été acclimatés aux conditions de laboratoire pendant un minimum de cinq (5) jours et avoir été associés à un identifiant unique à l'aide d'un moyen d'identification approuvé, par exemple le baguage, le marquage ou l'identification biométrique.

#### **3.3.2 Affectation au groupe traité ou au groupe témoin**

Les animaux doivent être répartis dans le groupe témoin ou le groupe traité suivant une méthode aléatoire stratifiée, de manière à réduire les biais et à assurer la comparabilité des variables pertinentes entre les deux groupes. Le processus d'affectation doit être bien documenté. De façon générale, l'affectation est effectuée selon une stratification du poids corporel des animaux; par conséquent, toute procédure alternative d'affectation doit être justifiée. Au début de l'étude, la variation du poids des animaux d'essai doit être minimale, n'excédant pas  $\pm 20\%$  du poids moyen associé au sexe de l'animal.

## **3.4 PRÉPARATION DES DOSES**

### **3.4.1 Identification des substances témoins et des substances à tester**

La substance à tester doit être représentative de l'ingrédient d'aliments pour animaux à commercialiser. S'il s'agit d'une substance chimique, un seul lot doit être utilisé tout au long de l'étude. Il faut fournir le numéro de lot, la date de fabrication, la date d'expiration ainsi qu'un certificat d'analyse. Si l'ingrédient d'aliments pour animaux est considéré comme un nouvel ingrédient en raison de modifications génétiques, de changements dans le procédé de fabrication ou pour d'autres raisons, il faut bien exposer les différences prévues d'avec le matériel parental. Au besoin, la substance à l'essai peut être dissoute ou mise en suspension dans un support approprié.

### **3.4.2 Composition et pureté de la substance à tester**

Avant d'entreprendre l'étude, il convient de caractériser la substance à tester, notamment sa pureté et, si cela est techniquement possible, il faut aussi identifier et quantifier les contaminants et impuretés présents. L'analyse de la composition de la substance à tester est recommandée en raison de la présence possible de minéraux ou de composants antinutritionnels inhérents aux ingrédients d'aliments pour animaux. L'incorporation d'une teneur élevée d'un tel ingrédient d'aliments pour animaux dans le régime alimentaire des animaux pourrait entraîner un effet antinutritionnel, voire toxique.

### **3.4.3 Formulation de la forme posologique**

La substance à tester doit être administrée par voie orale, conjointement avec la ration alimentaire, l'eau potable ou par gavage, en fonction de la nature de la substance à tester et de l'objectif de l'étude. Pour le choix du support approprié et des autres additifs, il convient de tenir compte des caractéristiques suivantes : les effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la rétention de la substance à tester ; les effets sur les propriétés chimiques de la substance à tester testée qui pourraient en modifier les caractéristiques toxiques; et les effets sur la consommation d'eau ou d'aliments ou encore sur l'état nutritionnel des animaux. Dans la mesure du possible, il est recommandé d'opter d'abord pour une solution aqueuse, puis d'envisager l'utilisation d'une solution dans l'huile, puis une solution dans d'autres types de supports. Le

Tableau 1 ci-dessous détaille les problèmes à considérer en matière de formulation lors de l'établissement de régimes alimentaires destinés aux animaux dans le cadre d'études de toxicité.

*Tableau 1 – Problèmes de formulation à considérer pour l'établissement de régimes alimentaires destinés aux animaux dans le cadre d'études de toxicité*

<p style="text-align: center;"><b><i>Stabilité et homogénéité</i></b></p> <p>Si la substance témoin ou la substance à tester doit être ajoutée aux aliments ou à un autre support, il convient de déterminer la période de stabilité de la substance à tester dans un tel mélange avant d'entreprendre l'étude. Son homogénéité et sa concentration doivent aussi être déterminées avant le début de l'étude et de façon périodique au cours d'étude. Des échantillons représentatifs du mélange doivent être analysés pour s'assurer que les procédures appropriées de mélange, de formulation et de stockage ont été suivies et que le mélange alimentaire contient la concentration appropriée de la substance témoin ou à tester.</p>
<p style="text-align: center;"><b><i>Substance à tester à faible valeur calorique</i></b></p> <p>Si la substance à tester n'a aucune valeur calorique et qu'elle constitue une part importante du mélange (p. ex., plus de 5 %), il est possible que les densités caloriques et nutritives du régime à dose élevée soient diluées par rapport aux régimes des autres groupes. En conséquence, certains animaux traités avec la dose élevée pourraient absorber une quantité de substance à tester plus élevée que prévu, puisque les animaux pouvant se nourrir à volonté d'un tel régime dilué sont susceptibles d'en consommer davantage que ceux d'autres groupes afin de compenser le faible apport nutritif et calorique des régimes à dose élevée. Dans ces circonstances, il est particulièrement important de surveiller la consommation d'aliments de ces animaux aussi étroitement et précisément que possible afin de déterminer si les changements observés sont attribuables à la toxicité manifeste de la substance à tester ou plutôt à un déséquilibre nutritionnel. Afin de faciliter une telle évaluation, deux groupes témoins peuvent être utilisés: un premier recevant un régime témoin non dilué, et un second recevant un régime témoin supplémenté en substance inerte (p. ex., de la méthylcellulose) à un pourcentage égal au pourcentage le plus élevé de la substance à tester dans la ration.</p>
<p style="text-align: center;"><b><i>Support présentant une valeur calorique ou nutritionnelle</i></b></p> <p>Lorsqu'on s'attend à ce que le support de la substance à tester ait une valeur calorique et/ ou nutritionnelle plus élevée que celle du régime alimentaire témoin, il peut être nécessaire d'ajuster les composants caloriques et/ ou nutritionnels.</p>

***Substance à tester présentant une texture ou un goût désagréable – gavage par voie orale ou alimentation par paires***

Lorsqu'on s'attend à ce que la substance à tester ait un effet sur la prise alimentaire en raison d'une texture ou d'un goût désagréable, il peut être nécessaire de procéder par gavage. Cependant, quoiqu'exigeant plus de ressources, l'alimentation par paires peut aussi constituer un bon moyen d'éliminer les différences de consommation entre le groupe témoin et le groupe traité avec la substance à tester. Si le protocole d'étude prévoit le modèle d'alimentation par paires, il convient d'apparier des rats sevrés issus d'une même portée, de même sexe et de taille comparable. Un des rats de chaque paire recevra la ration témoin et l'autre, la ration expérimentale. On offre alors à l'animal du groupe témoin une quantité d'aliments égale à celle qui a été offerte le jour précédent à l'animal du groupe traité qui lui est associé. Les animaux doivent être logés individuellement afin que l'on puisse mesurer la prise alimentaire quotidienne de chacun. Si la substance à tester n'est pas nutritive et constitue une part importante de la ration alimentaire, l'animal témoin doit recevoir une quantité d'aliments lui permettant de consommer une quantité d'éléments nutritifs équivalente à celle de la ration offerte à l'animal traité qui lui est associé. De plus, l'étude doit prévoir un second groupe d'animaux témoins nourris à volonté afin de veiller à ce que le résultat expérimental observé soit attribuable aux différences d'apport énergétique ou nutritionnel.

***Substance à tester interférant avec l'absorption des éléments nutritifs***

Lorsque la substance à tester interfère avec l'absorption des éléments nutritifs, entraînant des carences nutritionnelles ou des modifications dans les rapports d'éléments nutritifs, cela peut perturber l'évaluation des paramètres toxicologiques considérés. Par exemple, les vitamines liposolubles peuvent préférentiellement se répartir avec une huile minérale ou un substitut de matière grasse qui n'est que très peu absorbé, causant ainsi une carence potentielle en ces vitamines. Cette possibilité peut être éliminée en enrichissant les aliments des groupes traités avec des éléments nutritifs supplémentaires.

## **4. PROCÉDURE**

### **4.1 PLACEMENT DES ANIMAUX**

Les animaux de tous les groupes doivent être mis à l'étude le même jour. Si le grand nombre d'animaux rend la tâche impossible, ces derniers peuvent être placés à l'étude au cours de plusieurs jours. Dans ce dernier cas, pendant le processus d'affectation, un nombre attribué d'animaux témoins et d'animaux traités de chaque dosage doit être mis à l'étude chaque jour de départ respectif afin d'assurer la concordance (départ échelonné).

## 4.2 NOMBRE ET SEXE DES ANIMAUX D'ESSAI

L'étude doit prévoir un minimum de 20 animaux – 10 par sexe – pour chacune des doses étudiées. Si des euthanasies intermédiaires sont prévues, il faut ajouter à ce minimum le nombre prévu d'animaux à euthanasier avant la fin de l'étude. Si l'étude comprend une phase de rétablissement (sans dosage), celle-ci doit compter au moins cinq (5) animaux de chaque sexe par groupe. Enfin, un protocole d'essai qui prévoit l'utilisation d'animaux d'un seul sexe doit être justifié scientifiquement.

## 4.3 DOSAGE

### 4.3.1 Groupes de traitement

Il convient d'utiliser au moins trois doses distinctes et un groupe témoin concomitant, sauf dans le cas d'un essai de dose limite (voir la section 4.3.5).

### 4.3.2 Choix des doses de traitement

Les niveaux de doses peuvent reposer sur les résultats d'études à doses répétées ou de détermination d'intervalle des études et doivent tenir compte des données toxicologiques et toxicocinétiques existantes et disponibles pour la substance testée ou les matériaux apparentés. À moins que la nature physicochimique ou les effets biologiques de la substance à tester n'imposent une limite donnée, les facteurs suivants doivent être considérés lors de la conception et de l'exécution d'études de toxicité :

- La dose la plus élevée doit être établie dans le but d'induire des effets toxiques, sans toutefois causer la mort ni de graves souffrances. Aucune dose ne doit entraîner une incidence de mortalité nuisant à une évaluation sérieuse des données obtenues,
- La dose minimale testée ne devrait pas induire de réponses toxiques chez les animaux d'essai; elle représenterait une DSENO,
- Les doses administrées doivent suivre une séquence décroissante, de sorte que toute réponse liée au dosage puisse être démontrée,
- Les niveaux de doses intermédiaires doivent produire une gradation des effets toxiques et être suffisamment élevés pour provoquer des effets toxiques minimes

chez les animaux d'essai (tels que des modifications des taux d'enzymes ou de légères diminutions dans les prises de poids corporel)

Les intervalles de deux à quatre fois constituent souvent une approche optimale pour établir les niveaux de doses décroissants, et l'ajout d'un quatrième groupe traité est souvent préférable à l'utilisation d'intervalles très larges (p. ex., selon un facteur supérieur à environ 6 à 10) entre les doses.

### **4.3.3 Groupe témoin**

Il faut prévoir un groupe témoin concomitant, c'est-à-dire un groupe d'animaux non traités ou ne recevant que le support, si la substance à tester est administrée au moyen d'un support. À l'exception du traitement avec la substance d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être manipulés de façon identique à ceux des groupes traités. Si on utilise un support, le plus grand volume utilisé de celui-ci doit être administré aux animaux du groupe témoin. Si une substance à tester est administrée dans les aliments et qu'elle entraîne une baisse de la prise alimentaire, il peut être utile de recourir à une alimentation par paires afin de faire la distinction entre les baisses attribuables à l'appétence et celles dues aux changements toxicologiques du modèle testé.

### **4.3.4 Groupes satellites**

Si l'étude prévoit l'évaluation de certains paramètres, par exemple le prélèvement de sang pour vérifier l'exposition ou le prélèvement de tissus à soumettre à des essais spécifiques, il convient de former des groupes satellites. Ceux-ci doivent compter le nombre minimal d'animaux de chaque sexe pour obtenir les paramètres souhaités. Un groupe satellite de 10 animaux – 5 de chaque sexe – peut être traité pendant 90 jours avec la dose élevée, et observé pendant une période subséquente de longueur appropriée, normalement au moins 28 jours, afin de déceler la réversibilité, la persistance ou l'apparition retardée d'effets toxiques pendant une période postérieure au traitement. Il convient également d'ajouter à l'étude satellite un groupe témoin de 10 animaux (5 par sexe).

### ***Types de groupes satellites – Critères de paramètres proposés pour l'évaluation et dispositions à prendre***

Des données doivent être mesurées chez tous les animaux vivants (poids corporel, consommation alimentaire et observations cliniques) – ceux de l'étude principale ou ceux des groupes satellites – afin que l'état de santé soit évalué correctement et que les bonnes doses soient calculées. Les dispositions générales à prendre pour chacun des groupes doivent être présentées en détail dans le protocole d'étude.

**Groupe toxicocinétique** – Animaux désignés à l'évaluation des concentrations sanguines de la substance à tester ou des métabolites associés. Comme les animaux de ce groupe seront soumis à des prélèvements sanguins répétés, et qu'ils seront donc traités différemment de ceux de l'étude principale, ils peuvent être euthanasiés sans subir d'examen général et de collecte de tissus après le dernier prélèvement sanguin.

**Groupe de rétablissement** – Animaux désignés qui seront conservés après la période de dosage afin d'évaluer la persistance, la réversibilité ou peut-être l'apparition retardée des effets toxiques. Les animaux de ce groupe doivent être traités de la même façon que ceux de l'étude principale en ce qui concerne les paramètres à évaluer et les échantillons à prélever, y compris faire l'objet d'une nécropsie macroscopique complète et d'un examen histopathologique, le cas échéant.

**Groupe d'euthanasie intermédiaire** – Animaux désignés pour être euthanasiés sans cruauté avant la fin de la période de dosage aux fins de l'évaluation de la toxicité à court terme. Les animaux de ce groupe doivent être traités de la même façon que ceux de l'étude principale en ce qui concerne les paramètres évalués et les échantillons prélevés, y compris faire l'objet d'une nécropsie macroscopique complète et d'un examen histopathologique, le cas échéant.

**Autres groupes** – Il est possible d'ajouter d'autres groupes à l'étude afin d'évaluer des paramètres spécifiques qui exigent que les animaux soient traités pour une durée identique à ceux de l'étude principale. Ces animaux peuvent notamment servir à l'évaluation des paramètres du métabolisme, à des fins d'imagerie, à des essais ex vivo nécessitant des échantillons de tissus ou à l'évaluation des paramètres d'immunologie.

#### **4.3.5 Dose limite**

Si un essai mené avec un niveau de dose équivalent à au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour, utilisant les procédures décrites pour cette étude, ne produit aucun effet indésirable observable et que, en fonction des données portant sur des composés de structure

apparentée, on ne s'attend pas à déceler de la toxicité, alors il n'est peut-être pas nécessaire de procéder à une étude complète comportant trois niveaux de doses. L'essai de la dose limite s'applique sauf si l'exposition de l'espèce visée indique qu'il faut utiliser une dose plus élevée (c.-à-d. supérieure à 1000 mg/kg de poids corporel/jour).

#### **4.3.6 Administration des doses**

Les animaux d'essai reçoivent quotidiennement la substance à tester sept jours par semaine pendant une période de 90 jours. Si la substance à tester est ajoutée à l'eau ou à la ration alimentaire, l'exposition doit se produire tous les jours de la semaine. Le traitement doit être administré de la même façon à tous les animaux pendant toute la durée de l'étude.

#### **4.3.7 Voie d'administration**

Dans la mesure du possible, la voie d'administration de la substance à tester doit se rapprocher de celle d'une exposition que subirait l'animal en temps normal. Pour les ingrédients d'aliments pour animaux, il convient de les administrer par voie orale, soit en l'ajoutant à la ration alimentaire ou à l'eau potable ou en procédant par gavage.

##### **4.3.7.1 Ajout à la ration**

L'administration par voie alimentaire constitue la solution privilégiée. La substance à tester est alors consommée en tant qu'aliments solides ou dans une combinaison solide-liquide. Si la substance est ajoutée à la ration alimentaire, les animaux ne doivent pas être en mesure de consommer de manière sélective ni les aliments de base ni la substance à tester contenue dans la ration en se fondant sur la couleur, l'odeur ou la taille des particules. Si la substance à tester est mélangée à des aliments moulus, puis que le mélange est granulé, aucune étape du processus de granulation ne devrait affecter la substance à tester (p. ex., les substances thermolabiles peuvent être détruites lors d'une granulation par un procédé à la vapeur). Lorsque la substance à tester est administrée dans la ration, il convient d'utiliser une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliments ou parties par million) ou encore une dose constante en fonction du poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel). Toute autre concentration doit être précisée.



#### **4.3.7.2      Dissolution dans l'eau potable**

L'administration par dissolution dans l'eau potable doit être envisagée s'il s'agit du mode d'ingestion le plus probable pour la substance à tester ou si, pour diverses raisons, l'ajout à la ration ne convient pas. La quantité de substance à tester administrée dans l'eau potable doit être exprimée en mg par ml d'eau ou constituer une dose constante en fonction du poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel). Toute autre concentration doit être précisée.

#### **4.3.7.3      Gavage par voie orale**

Si les deux méthodes précédentes sont jugées insatisfaisantes ou si l'exposition devrait se faire par l'ingestion quotidienne de doses uniques à niveaux élevés plutôt que par l'ingestion continue de faibles doses, le gavage par voie orale doit être envisagé. S'il s'agit du mode d'administration retenu, le gavage doit être effectué en une seule dose aux animaux à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée; Un dosage fractionné (p. ex., à quelques heures d'intervalle) peut être envisagé si, en vertu des facteurs suivants, il est nécessaire d'atteindre une dose élevée:

- Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal et du support,
- Le volume administré ne doit pas dépasser 1 ml par 100 g de poids corporel, sauf s'il s'agit d'une solution aqueuse où il est possible d'utiliser une dose de 2 ml par 100 g de poids corporel,
- À l'exception des substances irritantes ou corrosives qui révéleront normalement des effets exacerbés à des concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité des volumes administrés en ajustant la concentration de manière à assurer un volume constant à tous les niveaux de doses.

Dans le cas d'une substance à tester administrée par gavage, la dose doit être donnée à peu près à la même heure chaque jour et ajustée à intervalles (hebdomadaires ou à la quinzaine) afin que la dose demeure constante en fonction du poids corporel.

### **4.4      OBSERVATIONS**

La période d'observation minimale est de 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite devant être soumis à des observations de suivi doivent être gardés pendant une période

appropriée sans subir de traitement afin de permettre la détection de persistance d'effets toxiques ou d'un éventuel rétablissement après avoir subi de tels effets. Cette période est généralement d'au moins 28 jours.

#### **4.4.1 Observations cliniques générales des animaux d'essai**

Il convient d'effectuer des observations cliniques générales des animaux en cage au moins une fois par jour, de préférence à la même heure chaque jour, en tenant compte des périodes de pointe des effets anticipés après le traitement. L'état clinique des animaux doit être consigné au moins deux fois par jour, généralement au début et à la fin de chaque journée. Les observations sont normalement espacées d'au moins six heures. Tous les animaux doivent être observés à la recherche de signes d'effets pharmacologiques et toxicologiques, de morbidité et de mortalité. Les animaux moribonds doivent être euthanasiés, pesés, et l'heure de la mort consignée. Toutes les mesures qui s'imposent doivent être prises pour minimiser la perte d'animaux en cours d'étude (p. ex., nécropsie ou réfrigération des animaux trouvés morts, et isolement ou euthanasie des animaux faibles ou moribonds).

L'adoption de pratiques d'élevage adéquates devrait minimiser la perte d'animaux et de tissus ou d'organes par autolyse lors de l'étude. Un taux d'autolyse supérieur à la norme pourrait entraîner une répétition de l'étude. Afin de réduire au minimum les pertes de tissus par autolyse, la nécropsie doit être effectuée peu de temps après la mort d'un animal (par euthanasie ou s'il est trouvé mort). Lorsque la nécropsie ne peut être effectuée immédiatement, l'animal doit être réfrigéré à une température suffisamment basse pour prévenir l'autolyse, mais pas trop basse pour endommager les cellules. Si un examen histopathologique est prévu, il faut prélever des échantillons de tissus sur l'animal et les placer dans des fixateurs appropriés au moment de la nécropsie. Un taux de mortalité excessif dû à une mauvaise gestion des animaux est inacceptable et pourrait entraîner une répétition de l'étude. Par exemple, dans des circonstances normales, la mortalité au sein du groupe témoin ne doit pas excéder celle figurant dans les données de contrôle historiques pertinentes pour le laboratoire, l'espèce et la lignée concernés.

#### **4.4.2 Poids corporel, consommation d'aliments et d'eau**

Tous les animaux doivent être pesés au début de l'expérience, au moins une fois par semaine au cours de l'expérience, et à la fin. La consommation des aliments doit être mesurée au moins une fois par semaine, avec une quantification des aliments perdus. Si la substance à

tester est administrée dans l'eau potable, la consommation d'eau doit être mesurée au moins une fois par semaine. La consommation d'eau doit aussi être envisagée pour les études alimentaires ou par gavage au cours desquelles elle pourrait s'en voir modifiée.

### **4.4.3 Examens cliniques**

Il convient d'effectuer les examens suivants : examen ophtalmologique, établissement des profils hématologiques, tests de chimie clinique et analyse d'urine. Ces examens doivent être menés comme décrit dans les sections suivantes.

#### **4.4.3.1 Examens physiques détaillés**

Des observations cliniques détaillées de chaque animal doivent être effectuées au moins une fois avant la première exposition (afin de permettre des comparaisons entre les sujets), et une fois par semaine par la suite. Les animaux doivent être observés hors de leurs cages, de préférence dans une aire normalisée et à des moments semblables à chaque occasion. Le laboratoire responsable de l'essai doit consigner ses observations avec soin, de préférence au moyen d'un système de notation clairement définis. Il faut déployer tous les efforts pour minimiser la variation des conditions d'observation. Les signes relevés comprennent notamment les changements de la peau, du pelage, des yeux, des muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excréments ainsi que les activités nerveuses autonomes (p. ex., le larmolement, l'érection des poils, la taille des pupilles et la respiration irrégulière). Les changements de démarche, de posture et de réaction aux manipulations ainsi que la présence de mouvements toniques ou cloniques, de stéréotypes (p. ex., toilettage excessif, cercles répétitifs) ou de comportement étrange (p. ex., l'animal s'automutile, marche à reculons) doivent également être consignés [16, 3].

#### **4.4.3.2 Examen ophtalmologique**

L'examen ophtalmologique doit être effectué par une personne qualifiée. Il doit être réalisé à l'aide d'un ophtalmoSCOPE ou d'un appareil équivalent, avant l'administration de la substance à tester de même qu'à la fin de l'étude, de préférence chez tous les animaux, mais au moins chez ceux ayant reçu la dose élevée et ceux du groupe témoin. Si des changements oculaires sont relevés, il faut procéder à l'examen de tous les animaux.

#### 4.4.3.3 Examens de la neurotoxicité

Vers la fin de la période d'exposition, mais jamais avant la 11<sup>e</sup> semaine d'étude, il convient d'évaluer la réactivité des animaux à divers types de stimuli [16, 15] (p. ex., stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs) [17, 18, 19] ainsi qu'une évaluation de la force de préhension [20] et de l'activité motrice [21]. Il n'est pas nécessaire d'effectuer des observations fonctionnelles vers la fin de l'étude si des données à cet effet provenant d'autres études sont disponibles et que les observations cliniques quotidiennes n'ont révélé aucun déficit fonctionnel. Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent également être omises pour les groupes démontrant par ailleurs des signes de toxicité dans une mesure qui interférerait significativement avec les résultats de ces examens fonctionnels.

### 4.5 HÉMATOLOGIE ET BIOCHIMIE CLINIQUE

Des échantillons sanguins doivent être prélevés d'un emplacement désigné puis, s'il y a lieu, conservés dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des échantillons sont prélevés juste avant l'euthanasie des animaux ou selon les dispositions prévues dans le protocole d'euthanasie.

#### 4.5.1 Hématologie

Les examens hématologiques suivants doivent être effectués à la fin de la période d'essai et lors de la collecte d'échantillons sanguins au cours de l'étude :

- Hématocrite
- Taux d'hémoglobines
- Numération des érythrocytes
- Numération des réticulocytes
- Numération des leucocytes et formule leucocytaire
- Volume corpusculaire moyen
- Teneur globulaire moyenne en hémoglobine
- Numération plaquettaire
- Temps et potentiel de coagulation (temps de coagulation, temps de prothrombine, temps de thromboplastine)

Un frottis de moelle osseuse est recommandé et doit être préparé particulièrement si des changements liés au traitement sont suspectés dans les tissus, les organes ou dans le sang périphérique. Cette activité peut en outre servir à diagnostiquer une maladie hématologique, à en confirmer la présence ou à en définir le stade, et est un outil de diagnostic des troubles non hématologiques (p. ex., une thésaurismose ou une infection généralisée) de même que des tumeurs malignes.

#### **4.5.2 Biochimie clinique**

Il est recommandé de laisser les animaux jeûner toute une nuit avant le prélèvement sanguin. Ce jeûne nocturne est préférable pour la prise de diverses mesures dans le sérum et le plasma, notamment pour la glycémie. Cette recommandation s'explique par la variabilité accrue qui découlerait inévitablement du non-jeûne et qui tendrait de masquer des effets plus subtils et compliquerait l'interprétation des résultats. Cependant, le jeûne nocturne peut interférer avec le métabolisme général des animaux et, particulièrement dans les études portant sur l'alimentation, peut perturber l'exposition quotidienne à la substance à tester. Si on opte pour le jeûne nocturne, il convient de mener les examens fonctionnels avant de procéder à la détermination des facteurs de biochimie clinique.

La détermination de facteurs de biochimie clinique visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, plus précisément sur les reins et le foie, doit être réalisée au moyen d'échantillons sanguins prélevés sur chaque animal dans le cadre de la procédure d'euthanasie des animaux ou juste avant (à l'exception des animaux moribonds et/ ou ceux euthanasiés de manière intercurrentielle). Comme pour les analyses hématologiques, il est possible de procéder à un échantillonnage intérimaire aux fins d'analyses de biochimie clinique. Les analyses du plasma et du sérum doivent comprendre les paramètres suivants :

- Sodium
- Potassium
- Glucose
- Cholestérol total
- Lipoprotéines de haute densité (HDL)
- Lipoprotéines de basse densité (LDL)
- Urée
- Azote uréique sanguin

- Créatinine
- Protéines totales
- Albumine
- Plus de deux enzymes indicatrices de la présence d'effets hépatocellulaires, dont les suivantes :
  - Alanine aminotransférase
  - Aspartate aminotransférase
  - Phosphatase alcaline
  - Gamma-glutamyl transpeptidase
  - Sorbitol-déshydrogénase

On peut aussi mesurer d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) et d'acides biliaires, car de telles données peuvent, dans certaines circonstances, fournir des informations utiles.

Les facteurs de biochimie clinique doivent aussi être évalués à titre de possibles marqueurs de lésions tissulaires générales. D'autres analyses peuvent être effectuées si certaines propriétés connues de la substance à tester sont susceptibles d'influer sur des profils métaboliques connexes, notamment pour les éléments suivants :

- Calcium
- Phosphore
- Triglycérides à jeun
- Méthémoglobine
- Cholinestérase

Il convient de mesurer la concentration totale des hormones qui suivent dans les échantillons de sérum sanguin prélevés sur chaque animal du groupe principal ainsi que sur ceux des groupes satellites et/ou de rétablissement à la fin de l'étude :

- Thyroxine (T4)
- Triiodothyronine (T3)
- Thyroïdostimuline (TSH)

D'autres hormones peuvent aussi être mesurées au cas par cas :

- Testostérone
- Œstradiol
- Hormone folliculostimulante (FSH)

- Hormone lutéinisante (LH)

Les échantillons de sérum peuvent être conservés congelés en attendant la détermination des analyses hormonales les plus informatives en fonction des résultats observés pour d'autres paramètres (p. ex., le poids des organes et l'histologie). Les hormones peuvent être mesurées dans le plasma si une validation appropriée et des données de contrôle historiques sont disponibles.

**Les facteurs qui suivent peuvent avoir une incidence sur les concentrations hormonales absolues et sur la variabilité des résultats :**

- Moment de l'euthanasie sans cruauté en raison de la variation diurne de la concentration hormonale
- Stade du cycle œstral
- Mode d'euthanasie sans cruauté pour éviter un stress inutile aux animaux qui pourrait affecter les concentrations d'hormones
- La Trousse d'analyse pour les dosages hormonaux qui peuvent différer par leurs courbes d'étalonnage

Les échantillons sanguins destinés spécifiquement à la détermination des hormones doivent être prélevés à une heure comparable de la journée. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales peuvent varier en fonction de la trousse d'analyse utilisée. Ainsi, il peut être impossible de fournir des critères de performance fondés sur des données historiques uniformes. Les niveaux d'hormones de contrôle (mesurés dans le même laboratoire, la même lignée de rongeurs et au moyen de la même méthode) doivent être pris en compte pour déterminer si les changements observés sont accidentels ou liés au traitement. Dans la mesure du possible, le prélèvement, la manipulation et l'analyse des échantillons sanguins doivent être conformes aux meilleures pratiques [22]. Les laboratoires doivent déployer tous les efforts nécessaires pour maintenir les coefficients de variation témoins en-deçà de 25 pour les hormones T3 et T4, et en-deçà de 35 pour la TSH. Toutes les concentrations doivent être enregistrées en ng par ml. Dans le cadre de l'essai de la validation hormonale, il convient également d'analyser la stabilité de T3, de T4 et TSH entreposées dans les conditions prescrites.

### 4.5.3 Analyse d'urine

De façon facultative, il est possible de procéder à une analyse d'urine au cours de la dernière semaine de l'étude en utilisant une collecte chronométrée du volume d'urine afin de déterminer les paramètres suivants:

- Apparence
- Volume
- Osmolalité ou densité relative
- pH
- Protéine
- Glucose
- Présence de sang ou de cellules sanguines

### 4.5.4 Autres analyses

En outre, il faut envisager d'étudier les marqueurs sériques des lésions tissulaires générales. D'autres analyses peuvent être effectuées si certaines propriétés connues de la substance à tester sont susceptibles d'influer sur des profils métaboliques connexes et doivent être identifiées pour certaines classes de composés chimiques, ou au cas par cas.

Dans l'ensemble, il convient d'adopter une approche souple, en fonction de l'espèce animale utilisée ainsi que l'effet observé et/ ou attendu d'un composé donné. Si les données historiques de référence sont inadéquates, il faut déterminer s'il est nécessaire de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique avant d'entamer l'administration des doses. Il n'est généralement pas recommandé de générer ces données avant d'entreprendre le traitement [23].

## 5. PATHOLOGIE

### 5.1 NÉCROPSIE MACROSCOPIQUE

Tous les animaux doivent être soumis à une nécropsie macroscopique complète et détaillée menée par un pathologiste qualifié ou sous la supervision de ce dernier. La nécropsie macroscopique détaillée comprend un examen minutieux de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Un



tel examen s'applique également aux animaux euthanasiés de façon précoce et retrouvés morts au cours de l'étude, et il doit être réalisé le plus tôt possible après la mort. Si cela s'avère impossible, les animaux doivent être réfrigérés afin d'éviter l'autolyse et l'endommagement des cellules.

## 5.2 POIDS DES ORGANES

Il convient de déterminer le poids humide des organes ci-dessous pour tous les animaux, à l'exception de ceux trouvés morts ou euthanasiés prématurément. Le poids humide doit être déterminé dès que possible après la dissection de tout tissu adhérent afin d'éviter le dessèchement.

- Cerveau
- Reins
- Foie
- Cœur
- Rate
- Thymus
- Glandes surrénales
- Hypophyse
- Glande thyroïde
- Ovaires
- Utérus
- Épididymes
- Testicules
- Prostate, vésicules séminales et glandes coagulantes dans leur ensemble

L'hypophyse peut être pesée fraîche, immédiatement après la dissection ou après la fixation. En ce qui concerne le complexe prostate-vésicules séminales-glandes coagulantes, on peut peser d'abord l'ensemble entier, puis procéder à une dissection et peser la prostate séparément. La séparation du complexe prostatique doit être réalisée avec soin afin d'éviter la perforation des vésicules séminales gorgées de liquide. On peut aussi fixer le complexe prostate-vésicules séminales d'abord, puis en séparer les éléments et les peser par la suite.

On peut peser d'autres organes au besoin, en fonction de l'objectif de l'étude.

### 5.3 PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Il convient, à la fin de l'étude, de consigner les poids des testicules et des épидидymes de tous les mâles. Au moins un épидидyme par mâle doit être réservé aux fins d'un examen histopathologique. L'autre épидидyme peut servir au dénombrement facultatif [24] des paramètres suivants :

- Réserves de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme
- Morphologie des spermatozoïdes
- Mobilité des spermatozoïdes

Pour l'évaluation facultative de la morphologie des spermatozoïdes, un échantillon de spermatozoïdes issus des épидидymes ou du canal déférent doit être examiné à l'état humide ou fixé, et au moins 200 spermatozoïdes par échantillon sont classés comme normaux (la tête et la pièce médiane/queue semblent normales) ou anormaux. Des exemples d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent la fusion, les têtes isolées et les têtes et/ou queues difformes. Des têtes de spermatozoïdes déformées ou trop larges peuvent indiquer une spermiation déficiente. La mobilité des spermatozoïdes peut être évaluée immédiatement après l'euthanasie sans cruauté ou enregistrée aux fins d'analyses ultérieures. Le pourcentage de spermatozoïdes à motilité progressive peut être déterminé visuellement ou par analyse de mouvements assistée par ordinateur.

L'analyse des paramètres spermatiques peut se limiter aux mâles des groupes témoins et à dose élevée. Toutefois, si les résultats révèlent des effets liés au traitement, les groupes à doses plus faibles doivent aussi être examinés.

Lors de la nécropsie, il faut déterminer le stade du cycle œstral de toutes les femelles au moyen d'un frottis vaginal. Ces observations fourniront des informations sur le stade du cycle œstral au moment de l'euthanasie sans cruauté et aideront à l'évaluation histologique des tissus sensibles aux œstrogènes (voir le document d'orientation no 106, partie 3, de l'OCDE [4]).

### 5.4 PRÉPARATION DES TISSUS AUX FINS D'EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE

En vue de l'examen histopathologique, il convient de préparer des coupes de tissus énoncés dans le Tableau 2. Les échantillons peuvent être conservés dans le milieu de fixation et le colorant les plus appropriés pour le type de tissu et l'examen histopathologique ultérieur

prévu. Il est recommandé de conserver les testicules en les immergeant dans une solution de fixation de Bouin ou de Davidson modifiée, et les coupes transversales des tubules séminifères doivent être préparées selon la procédure applicable aux fins de l'examen histopathologique [25]. Se référer au document d'orientation no 106 de l'OCDE [4] pour la fixation et l'examen histologique des organes endocriniens.

Tableau 2 - Tissus à prélever et à préparer en vue d'un examen histopathologique

<b>Système d'organes</b>	<b>Tissus</b>
Système digestif	Glandes salivaires, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, plaques de Peyer (s'il y a lieu), foie, pancréas, vésicule biliaire (s'il y a lieu)
Système nerveux	Régions représentatives de l'encéphale, y compris le cerveau, le cervelet, la médulla et la protubérance; moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire; nerfs périphériques sciatique ou tibial – à proximité du muscle; yeux : rétine et nerf optique – si des changements ont été observés lors de l'examen ophtalmologique
Système glandulaire	Hypophyse; glandes surrénales, parathyroïdes et thyroïde; glandes de Harder
Système respiratoire	Trachée, poumons (gardés gonflés à l'aide d'une solution de fixation, puis immergés), pharynx, larynx, nez
Système cardiovasculaire/hématopoïétique	Aorte, cœur, moelle osseuse (et/ou aspirat frais), nœuds lymphatiques (préférentiellement un nœud lymphatique couvrant la voie d'administration et un autre éloigné de la voie d'administration, afin de relever les effets systémiques), rate, thymus
Système urogénital	Reins, vessie, testicules, épидидymes, complexe prostate-vésicules séminales-glandes coagulantes, utérus, ovaires (y compris les trompes de Fallope), glandes mammaires (mâles et femelles)
Autres	Lésions macroscopiques, tumeurs, peau, muscles squelettiques, os ou autres organes considérés comme des organes cibles selon les propriétés connues de la substance à tester.

## 5.5 HISTOPATHOLOGIE

Les organes et tissus de tous les animaux des groupes témoins et à dose élevée qui ont été conservés doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet. Si des changements liés au traitement sont observés au sein du groupe à dose élevée, l'examen doit aussi comprendre les organes cibles des animaux du sexe atteint issus des groupes ayant reçus d'autres doses. Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées. Si l'étude comporte un groupe satellite, il convient de mener chez les animaux de ce groupe un examen histopathologique des tissus et des organes touchés par des effets toxiques chez ceux des groupes traités.

## 5.6 DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ ENDOCRINIENNE

Les résultats obtenus pour les paramètres liés au système endocrinien doivent être interprétés dans le contexte du cadre conceptuel pour l'essai et l'évaluation des produits chimiques perturbateurs endocriniens [5] et du document d'orientation révisé 150 sur les lignes directrices normalisées pour l'évaluation des produits chimiques pour évaluer les perturbations endocriniennes [6] de l'OCDE. Ce dernier document insiste sur les paramètres endocriniens, qui devraient être combinés à la sensibilité existante aux effets neurologiques, immunologiques et reproducteurs. On y souligne également l'importance de mener des observations cliniques attentives sur les animaux, de manière à recueillir le plus de renseignements possibles. Les paramètres d'évaluation requis sont notamment les mesures de la thyroxine (T3), de la triiodothyronine (T4), de la thyroïdostimuline (TSH) ainsi que le poids de la glande thyroïde, qui sont tous des paramètres sensibles à la perturbation de la voie thyroïdienne [7]. De plus, il convient de déterminer les taux de cholestérol total sérique, de lipoprotéines de basse densité (LDL) et de lipoprotéines de haute densité (HDL) puisque ces paramètres sont directement régulés par l'action des hormones thyroïdiennes et ils contribuent à démontrer les effets thyroïdiens (conjointement avec d'autres critères thyroïdiens) [26]. Les critères facultatifs incluent d'autres mesures hormonales, ainsi que d'autres paramètres spermatiques. Le Tableau 3 présente les paramètres essentiels et facultatifs qui peuvent être modifiés par des effets endocriniens. L'évaluation des paramètres facultatifs peut être envisagée si les données existantes concernant la substance à tester ou des substances analogues suggèrent des effets possibles sur ces paramètres. On peut aussi décider de mener une telle évaluation en fonction des observations associées aux mesures requises collectées dans le cadre de ce présent document.

Tableau 3 – Paramètres pour la détection de l'activité endocrinienne

	<b>Paramètres essentiels</b>	<b>Paramètres facultatifs</b>
Poids des organes	Testicules Épididymes Glandes surrénales Complexe prostate-vésicules séminales-glandes coagulantes Utérus Ovaires Hypophyse Glande thyroïde	
Histopathologie	Glandes thyroïdes et parathyroïdes Glandes surrénales Hypophyse* Testicules Épididymes Lobes ventral et dorsolatéral de la prostate Vésicules séminales et glandes coagulantes Ovaires* Col de l'utérus* Vagin* Utérus* Frottis vaginal (prélevé lors de la nécropsie) pour déterminer le stade du cycle œstral* Glandes mammaires (femelles et mâles) *	Îlots pancréatiques

	<b><i>Paramètres essentiels</i></b>	<b><i>Paramètres facultatifs</i></b>
Analyses hormonales et biochimiques du sérum et du plasma	Cholestérol total Lipoprotéines de haute densité (HDL) Lipoprotéines de basse densité (LDL) Thyroxine (T4) Thyréostimuline (TSH) Triiodothyronine (T3)	Hormone folliculostimulante Hormone lutéinisante Œstradiol Testostérone
Paramètres spermatiques		Réserves de spermatozoïdes dans la queue des épидидymes Mobilité des spermatozoïdes Morphologie des spermatozoïdes

\* L'état des organes sensibles aux œstrogènes chez les femelles doit être évalué en fonction du stade du cycle œstral à la fin de l'étude, puisque les substances testées présentant une activité endocrinienne sont susceptibles d'entraîner des changements histologiques qui, bien qu'ils ne soient pas manifestement pathologiques, peuvent entraîner un changement de l'état prévu en fonction du stade du cycle ovarien (conformément au document d'orientation no 106, parties 3 et 4, de l'OCDE [4]).

## 6. DONNÉES ET RAPPORT

Le rapport d'étude doit présenter l'ensemble des données se rapportant à tous les paramètres précisés dans le protocole pour chacun des animaux étudiés. Toutes les données numériques doivent être synthétisées sous forme de tableaux présentant clairement les groupes traités et le nombre d'animaux dans chaque groupe à chaque point de collecte. Les données qualitatives doivent également être résumées de façon à indiquer l'incidence globale des résultats, de sorte que les effets liés à la substance à tester puissent être bien interprétés. Des détails supplémentaires doivent être fournis en ce qui concerne les décès prématurés, y compris les animaux euthanasiés in extremis et les animaux retrouvés morts. Ce détail doit comprendre les signes cliniques individuels, le début et la gravité de la toxicité, la pathologie clinique applicable, ainsi que les pathologies macroscopique et microscopique en vue d'établir la cause de la morbidité ou de la mortalité. Il est fortement déconseillé d'exclure du rapport toute donnée

recueillie au cours de l'étude, une telle omission pouvant contrevenir aux exigences des Bonnes Pratiques de Laboratoire et d'autres normes de qualité applicables.

S'il y a lieu, les données numériques doivent être évaluées au moyen de méthodes statistiques appropriées et généralement acceptées. Lorsque le logement de groupe est utilisé et que la substance est administrée dans les aliments ou dans l'eau potable, l'unité expérimentale correspond à la cage, et non à l'animal. Ces méthodes statistiques doivent être détaillées dans le protocole d'étude ainsi que dans le rapport d'étude.

À des fins de contrôle de la qualité, il est proposé de comparer les données de contrôle aux valeurs de contrôle provenant du même laboratoire, espèce, lignée, et recueillies dans des conditions similaires. De plus, il convient de calculer les coefficients de variation pour les paramètres continus de l'activité endocrinienne (tableau 3). Ces données pourront servir à comparer différentes études. Il convient de tenir compte des différences qui existent entre les lignées de rats lors de l'évaluation des données de contrôle historiques.

## 7. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les renseignements ci-dessous:

Substance testée:

- Identification chimique, par exemple le(s) nom(s) IUPAC ou CAS, le(s) numéro(s) de registre CAS, le code SMILES ou InChI, la formule développée et/ou d'autres identifiants
- Source, numéro de lot, date limite d'utilisation (si disponible)
- Stabilité du produit chimique, si elle est connue
- Nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physicochimiques
- Identifiant, y compris le numéro CAS s'il est connu/ établi; et
- Pureté
- Certificat d'analyse

Substance à composant unique:

- Apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes

Substance à composants multiples, mélanges et substances chimiques de compositions inconnues ou variables, produits de réactions complexes et matériaux biologiques (CBIV):

- Caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), l'occurrence quantitative et les propriétés physicochimiques pertinentes des composants

Support, s'il y a lieu:

- Justification du choix de support, si autre que l'eau

Animaux d'essai:

- Espèce et lignée utilisées
- Nombre, âge et sexe des animaux
- Provenance, conditions de logement, régime alimentaire, etc.
- Poids individuel des animaux au début de l'étude, et
- Justification de l'espèce, si autre que le rat

Conditions de l'étude

- Justification du choix du niveau de dose
- Détails concernant la formulation de la substance testée/ la préparation du régime alimentaire, concentration obtenue, stabilité et homogénéité de la préparation
- Détails concernant l'administration de la substance testée
- Doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance testée dans la ration alimentaire/ eau potable (ppm) en dose réelle s'il y a lieu; et
- Détails concernant la qualité de l'eau et des aliments

Résultats:

- Poids corporel et variations de poids corporel
- Consommation d'aliments et consommation d'eau, s'il y a lieu



- Données de réponse toxique selon le sexe et le niveau de dose, y compris les signes de toxicité
- Nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non)
- Résultats de l'examen ophtalmologique
- Évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice (s'il y a lieu)
- Analyses hématologiques avec des valeurs de référence pertinentes
- Analyses de biochimie clinique avec des valeurs de référence pertinentes
- Hormones thyroïdiennes circulantes (T4, T3, TSH; obligatoire)
- Autres mesures hormonales (facultatif)
- Méthode de détermination des valeurs hormonales (type d'analyse, fournisseur, protocole, etc.)
- Poids corporel à la fin de l'étude, poids des organes et ratio poids organe/ poids corporel
- Résultats de la nécropsie
- Cytologie vaginale terminale
- Description détaillée de tous les résultats histopathologiques
- Nombre total de spermatozoïdes dans la queue des épидидymes, pourcentage de spermatozoïdes à motilité progressive, pourcentage de spermatozoïdes présentant une morphologie normale, et pourcentage de spermatozoïdes présentant chacune des anomalies identifiées (facultatif)
- Données sur l'absorption (p. ex., absorption, distribution, métabolisme, excrétion (ADME) ou données toxicocinétiques) si analysées
- Traitement statistique des résultats, s'il y a lieu
- Justification de la décision d'euthanasier des animaux avant la phase finale de l'étude; et
- Pour les animaux trouvés morts au cours de l'étude, établir la cause du décès, si possible.

Interprétation des résultats:

Conclusions:

## 8. BIBLIOGRAPHIE

### 8.1 CODEX ALIMENTARIUS

1. Codex Alimentarius, Code d'usages pour une bonne alimentation animale (CAC/RCP 54-2004)

### 8.2 OCDE

2. *Ligne directrice n° 408 de l'OCDE : Toxicité orale à dose répétée - rongeurs : 90 jours*. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.
3. OECD Environment Directorate Joint meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Ed. 2000, Paris.
4. OCDE Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Series on Testing and Assessment No 106. OECD Ed. 2009, Paris.
5. OCDE Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Series on Testing and Assessment No 150. OECD Ed. 2012, Paris.
6. OCDE. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. OECD Ed. 2018, Paris.
7. OCDE Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Detailed review paper on thyroid hormone disruption assays. Series on Testing and Assessment No 57. OECD Ed. 2006, Paris.

### 8.3 VICH

8. VICH, Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: General approach to testing, Coopération internationale pour l'harmonisation des exigences techniques s'appliquant à l'enregistrement des produits médicaux vétérinaires, 2009. VICH GL33.

<https://vichsec.org/component/attachments/attachments/319.html?task=download>

9. VICH, Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: Repeat-dose (90 days) toxicity testing, Coopération internationale pour l'harmonisation des exigences techniques s'appliquant à l'enregistrement des produits médicaux vétérinaires, 2004. VICH GL31.

<https://vichsec.org/component/attachments/attachments/317.html?task=download>

## 8.4 ÉTATS-UNIS

10. U.S. FDA, Chapter IV.C.4.a. Subchronic Toxicity Studies with Rodents, dans Redbook 2000: Guidance for Industry and Other Stakeholders Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients, 2003, U.S. FDA.

[www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm222779.pdf](http://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm222779.pdf)

11. U.S. EPA, 90-Day Oral Toxicity in Rodents, dans OPPTS 870.3100 Health Effects Test Guidelines, U.S. Environmental Protection Agency, Éditeur. 1998.

<https://tinyurl.com/ycmlpox3>

## 8.5 UNION EUROPÉENNE

12. EFSA, Outcome of the public consultation on the draft EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed, EFSA Supporting Publications, 2011. 8(12).

<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-205>

13. EFSA, Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed, EFSA Journal, 2011. 9(12).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2438>

14. EFSA, Explanatory statement for the applicability of the Guidance of the EFSA Scientific Committee on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed for GMO risk assessment. EFSA Journal, 2014. 12(10).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3871>

15. CEE, Directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, Journal officiel, 1986. 29 (L358, 18 décembre 1986).

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A31986L0609>

## 8.6 AUTRES

16. IPCS, Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, International Program on Chemical Safety (IPCS), Environmental Health Criteria Document, 1986. No. 60.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>
17. Tupper, D.E. et R.B. Wallace, Utility of the neurological examination in rats, *Acta neurobiologiae experimentalis*, 1980 40(6): p. 999-1003.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7234526>
18. Gad, S.C., A neuromuscular screen for use in industrial toxicology, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1982. 9(5-6): p. 691-704.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6750143>
19. Moser, V.C., K.L. McDaniel, et P.M. Phillips, Rat strain and stock comparisons using a functional observational battery: baseline values and effects of amitraz, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991. 108(2): p. 267-83.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2017756>
20. Meyer, O.A., H.A. Tilson, W.C. Byrd, et M.T. Riley, A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice, *Neurobehavioral Toxicology*, 1979. 1(3): p. 233-6.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/551317>
21. Crofton, K.M., J.L. Howard, V.C. Moser, M.W. Gill, L.W. Reiter, H.A. Tilson, et R.C. MacPhail, Interlaboratory comparison of motor activity experiments: implications for neurotoxicological assessments, *Neurotoxicology and Teratology*, 1991. 13(6): p. 599-609.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779947>
22. Kucheryavenko, O., G. Lurman, A. Lehman, J. Bras, L. Niemann, A. Terron, I. Chabhoud, A. Mantovani, H. Hakansson, S. Schneider, V. Ritz, et R. Solecki, Report from the BfR Expert Hearing on Practicability of Hormonal Measurements, *Arch Toxicol.* (en prép.), 2018.
23. Weingand, K., G. Brown, R. Hall, D. Davies, K. Gossett, D. Neptun, T. Waner, T. Matsuzawa, P. Salemink, W. Froelke, J.P. Provost, G. Dal Negro, J. Batchelor, M. Nomura, H. Groetsch, A. Boink, J. Kimball, D. Woodman, M. York, E. Fabianson-Johnson, M. Lupart, et E. Melloni, Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and safety studies. The Joint Scientific Committee for International Harmonization of Clinical Pathology Testing,

Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology, 1996. 29(2): p. 198-201.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742316>

24. Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni, et L.D. Wise, Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report, ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation, Reproductive Toxicology, 1996. 10(3): p. 237-44.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738562>

25. Russell, L.D., R.A. Ettlin, A.P. Sinha Hikim, et E.D. Clegg, Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, 1990, Cache River: Clearwater, FL.

26. Kovanen, P.T., Regulation of plasma cholesterol by hepatic low-density lipoprotein receptors, American Heart Journal, 1987. 113(2 Pt 2): p. 464-9

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3544761>

## 9. ABRÉVIATIONS

UE Union européenne

É. U. États Unis

DSENO Dose sans effet nocif observé