

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

ÉTUDES DE CANCÉROGÉNÈSE

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (LD) sont périodiquement revues à la lumière des progrès scientifiques, des nouvelles pratiques d'évaluation ainsi que de considérations relatives au bien-être animal. La Ligne directrice initiale sur les études de cancérogenèse (LD 451) a été adoptée en 1981. Sa révision a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4) (5). La mise à jour de la LD 451 a été effectuée en parallèle avec la révision des LD 452 (études de toxicité chronique) et 453 (études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente Ligne directrice vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente Ligne directrice est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente Ligne directrice et dans la LD 409 - Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours (6). Des informations complémentaires peuvent aussi être trouvées dans le Document d'orientation de l'OCDE No. 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques du produit chimique testé et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le Document d'orientation No. 116 (7).

© OCDE (2018)

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

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

4. La présente Ligne directrice porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de cancérogenèse. Bien que des études de cancérogenèse utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente Ligne directrice, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée ou l'inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances par voie cutanée (7) et par inhalation (7) (8). Les LD 412 (9) et 413 (10), ainsi que le Document d'orientation de l'OCDE sur l'essai de toxicité aiguë par inhalation (8), sont tout particulièrement consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. La LD 410 (11) est consultée dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

5. L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas des substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

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

- Identification des propriétés cancérogènes d'un produit chimique susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents;
- Identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la cancérogenèse;
- Identification du temps d'apparition des néoplasmes;
- Caractérisation de la relation entre la dose administrée et la réponse tumorale;
- Identification du niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR);
- Extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses;
- Obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle d'un produit chimique, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur le produit chimique testé avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel cancérogène de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le Document d'orientation No. 116 (7).

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

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le Document d'orientation No. 116 (7), ainsi que dans le Document d'orientation No. 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le Document d'orientation No. 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit : « Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à

l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration du produit chimique testé pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée. »

11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le Document d'orientation No. 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (LD 453) est menée (paragraphe 12).

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (LD 453) plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (LD 452) et une étude de cancérogenèse (LD 451). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une étude combinée (LD 453), il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphe 11 et 22 à 25) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

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

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. Le produit chimique testé est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux, pendant la plus grande partie de leur vie, à des doses progressives et habituellement par la voie orale. Les essais par inhalation ou par la voie cutanée peuvent aussi être appropriés. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente Ligne directrice traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à

l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le Document d'orientation No. 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le Document d'orientation No. 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable du produit chimique testé et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

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

PROTOCOLE***Nombre et sexe des animaux***

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Chaque groupe de dose, de même que chaque groupe témoin correspondant, comprend au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il est possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée entre les groupes de doses, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude, et sur le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique, dans le Document d'orientation No. 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude et groupes satellites (sentinelles)

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 12 mois, afin de recueillir des données sur la progression des altérations néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur le produit chimique testé, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. S'ils sont néanmoins inclus dans l'étude, les groupes d'animaux traités destinés à être sacrifiés en cours d'étude comptent normalement 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). Des informations complémentaires figurent dans le Document d'orientation No. 116 (7).

Groupes de dose et dosage

21. Le Document d'orientation No. 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance testée ou aux matières apparentées.

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

23. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques du produit chimique testé, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs mentionnés au paragraphe 23 ci-dessous, la plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %).

Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.

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

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

26. Comme le précise le Document d'orientation No. 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants :

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

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

Préparation des doses et administration du produit chimique testé

28. La substance à tester est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le Document d'orientation No. 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques du produit chimique testé, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

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

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

31. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne du produit chimique testé (à raison de 7 jours par semaine) et ce normalement pendant une période de 24 mois pour les rongeurs (voir aussi le paragraphe 32). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie la LD 410 (11), et ce pendant une période de 24 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 24 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées « nez seul », il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition

en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir aussi à ce sujet la LD 412 (9).

32. Lorsque le produit chimique testé est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, le composé chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est donc pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

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

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

OBSERVATIONS

34. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique devra aussi être effectuée une fois par jour en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage. Une attention particulière est accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

Poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, et efficacité alimentaire

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

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

36. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le Document d'orientation No. 116 (7). S'il y a lieu, des prélèvements sanguins en vue d'analyses hématologiques et de chimie clinique et des analyses d'urines peuvent être effectués dans le cadre de sacrifices réalisés en cours d'étude (paragraphe 20) et à la fin de l'étude sur un minimum de 10 animaux de chaque sexe par groupe. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital sous anesthésie, et seront conservés si nécessaire dans des conditions appropriées. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène ait été mise en question (32).

PATHOLOGIE***Autopsie macroscopique***

37. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20) font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut devoir être effectuée au cas-par-cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles ne sont pas collectées au-delà d'un an après le début de l'étude.

38. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (33) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif) :

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

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues du produit chimique testé sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des LD 412 (9) et 413 (10). Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

39. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (33). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants :

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

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

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

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

42. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

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

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques;

- données d'identification;
- provenance de la substance;
- numéro de lot;
- certificat d'analyse chimique;.

Véhicule (le cas échéant):

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

Animaux d'expérience:

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

Conditions expérimentales:

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

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

Résultats généraux

- Données sur la survie;
- Poids corporel/variations du poids corporel;
- Prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant;

- Données toxicocinétiques (si disponibles);
- Ophtalmoscopie (si disponible);
- Hématologie (si disponible);
- Chimie clinique (si disponible);

Résultats cliniques

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

Données relatives aux autopsies

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

Histopathologie

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

Traitement statistique des résultats, le cas échéant;

Discussion des résultats, notamment:

- Examen de toutes les approches de modélisation;
- Relations dose-réponse;
- Données de contrôle historiques;
- Examen de toutes les informations concernant le mode d'action;
- Détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé);
- Applicabilité des résultats à l'être humain;

Conclusions

RÉFÉRENCES

1. OCDE (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), OCDE, Paris.
2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC
<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=116283&CFID=1267360&CFTOKEN=65052793&jsessionid=9830b2c4116e3d8fbbf017414e1a782e7f79TR>
3. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32, 163-208.
4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.
5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437-445.
6. OCDE (1998), Toxicité orale à doses répétées - non-rongeurs : 90 jours, Ligne Directrice No. 409, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
7. OCDE (2009), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluation (proposition disponible sur le site internet public de l'OCDE relatif aux Lignes directrices pour les essais www.oecd.org/env/testguidelines).
8. OCDE (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluation No. 39, [ENV/JM/MONO\(2009\)28](#), Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
9. OCDE (2009), Toxicité à doses répétées par inhalation: étude sur 28 jours, Lignes Directrice No.412, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
10. OCDE (2009), Toxicité subchronique par inhalation : étude sur 90 jours, Lignes Directrice No. 413, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
11. OCDE (1981), Toxicité cutanée à doses répétées - étude à 21/28 jours, Lignes Directrice No. 410, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
12. Boobis, A.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M.E., Vickers, C., Willcocks, D. & Farland, W. IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, (2006) 36:793-801.
13. Cohen, S.M., Meek, M.E., Klaunig, J.E., Patton, D.E., et Fenner-Crisp, P.A. (2003) The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589

14. Holsapple, M.P., Pitot, H.C., Cohen, S.N., Boobis, A.R., Klaunig, J.E., Pastoor, T., Dellarco, V.L. & Dragan, Y.P. (2006) Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
15. Meek, E.M., Bucher, J.R., Cohen, S.M., Dellarco, V., Hill, R.N., Lehman-McKemmon, L.D., Longfellow, D.G., Pastoor, T., Seed, J. & Patton, D.E. A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* (2003). 33:591-653.
16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 1-7.
17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 9-35.
18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 37-68.
19. \$Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36, 69-98.
20. OCDE (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et Série sur les pesticides n° 14, [ENV/JM/MONO\(2002\)19](#), OCDE, Paris.
21. OCDE (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations No. 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](#), OCDE, Paris.
22. Rhomberg, LR, Baetcke, K, Blancato, J, Bus, J, Cohen, S, Conolly, R, Dixit R, Doe, J, Ekelman, K, Fenner-Crisp, P, Harvey, P, Hattis, D, Jacobs, A, Jacobson-Kram, D, Lewandowski, T, Liteplo, R, Pelkonen, O, Rice, J, Somers, D, Turturro, A, West, W, Olin, S. Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9) 729 - 837 (2007).
23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN et Lumley CE (1994) The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
25. Usui T, Griffiths SA et Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter, F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203

27. Directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Journal officiel 29, L358, 18 décembre 1986.
28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2. http://www.gv-solas.de/publ/heft1_1988.pdf
30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems. http://www.gv-solas.de/auss/hyg/hyg-p7_e.html
31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23. Available at: http://www.ff.up.pt/farmacologia/pdf/good_practice_lab_animals.pdf
32. Weingand, K., et al. 1996. Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.
33. Crissman, J., Goodman D., Hildebrandt P., et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32, 126-131.