

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

Etude de neurotoxicité pour le développement

INTRODUCTION

1. En juin 1995, à Copenhague, un Groupe de travail de l'OCDE sur la toxicité pour la reproduction et le développement a débattu de la pertinence d'une actualisation des Lignes directrices de l'OCDE existantes sur la toxicité pour la reproduction et le développement, et de l'élaboration de nouvelles Lignes directrices sur des effets qui ne sont pas actuellement couverts (1). Le Groupe de travail a recommandé la rédaction d'une Ligne directrice concernant la neurotoxicité pour le développement, fondée sur une ligne directrice de l'US EPA, révisée depuis (2). Une seconde réunion de consultation s'est tenue en juin 1996 à Copenhague avec pour objet de livrer au Secrétariat des informations sur l'avant-projet d'une nouvelle Ligne directrice sur la neurotoxicité pour le développement, notamment concernant des éléments majeurs tels que des précisions sur le choix de l'espèce animale, la période d'administration, la durée de l'essai, les effets à évaluer et les critères d'évaluation des résultats. Une Ligne directrice états-unienne sur l'évaluation des risques neurotoxiques a été publiée en 1998 (3). Une consultation d'experts de l'OCDE et un atelier de travail de l'Institut des sciences du risque ISLI se sont tenus parallèlement en octobre 2000, tandis qu'une consultation d'experts a eu lieu à Tokyo en 2005. Ces rencontres avaient dans leur ensemble pour objectif de débattre de questions scientifiques et techniques relatives à l'actuelle Ligne directrice et les recommandations qui en ont résulté (4)(5)(6)(7) ont été prises en compte lors de l'élaboration de cette Ligne directrice. Les Documents d'orientation No.43 "Reproductive Toxicity Testing and Assessment" et No.20 "Neurotoxicity testing" (9) contiennent d'autres informations sur la mise en œuvre, l'interprétation et la terminologie relatives à cette Ligne directrice.

REMARQUES PRELIMINAIRES

2. De nombreux produits chimiques sont connus pour entraîner des effets neurotoxiques sur le développement chez l'homme et chez d'autres espèces (10)(11)(12)(13). Il est parfois nécessaire de déterminer la neurotoxicité potentielle pour le développement d'une substance ou d'un mélange chimique (« substance d'essai ») et d'estimer et d'évaluer ses caractéristiques toxiques. Les études de neurotoxicité pour le développement ont pour objectif de produire des résultats relatifs aux effets fonctionnels et morphologiques potentiels exercés sur le système nerveux en développement de la progéniture après exposition *in utero* et aux premiers stades de la vie, notamment des caractérisations par des courbes de réponse à la dose.

3. Il est possible de mener une étude de neurotoxicité pour le développement sous forme d'une étude séparée intégrée dans une étude de toxicité pour la reproduction et/ou de neurotoxicité chez l'adulte (par exemple Lignes directrices 415 (14), 416 (15), 424 (16)), ou de l'adjoindre à une étude de toxicité pour le développement prénatal (par exemple Ligne directrice 414 (17)). Dans le cas de l'incorporation ou de l'annexion d'une étude de neurotoxicité pour le développement à une autre étude, il est impératif de maintenir l'intégrité des deux types d'études. Tous les essais doivent se conformer aux Lignes directrices gouvernementales et institutionnelles applicables à l'utilisation des animaux de laboratoire en recherche (par exemple, 18).

© OCDE, (2007).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

4. Le laboratoire qui mène l'essai doit tenir compte de toutes les informations disponibles sur la substance de l'essai avant de procéder à l'étude. Il s'agit notamment d'informations sur l'identité et la structure chimique de la substance ; sur ses propriétés physico-chimiques ; sur les résultats de tout autre essai de toxicité *in vitro* ou *in vivo* réalisé sur la substance ; sur les données toxicologiques relatives à d'autres substances apparentées ; et sur la ou les utilisations prévues de la substance. Il est nécessaire de disposer de ces renseignements pour remplir toutes les conditions démontrant que l'essai intéresse la protection de la santé humaine et contribuera à la sélection d'une dose initiale appropriée.

PRINCIPE DE L'ESSAI

5. La substance de l'essai est administrée aux animaux pendant les périodes de gestation et de lactation. Les mères sont testées pour évaluer les effets sur les femelles gravides et en lactation, avec pour objectif additionnel l'acquisition d'informations comparatives (mères versus progéniture). La neurotoxicité est évaluée sur des descendants sélectionnés au hasard dans les portées. Elle comprend des observations destinées à détecter des anomalies neurologiques macroscopiques et comportementales, notamment l'examen du développement physique, de l'ontogénie comportementale, de l'activité motrice, des fonctions motrices et sensorielles, et de l'apprentissage et de la mémoire, ainsi que l'évaluation pondérale du cerveau et de la neuropathologie au cours du développement postnatal et à l'âge adulte.

6. Lorsque la méthode d'essai fait l'objet d'une étude séparée, il est possible d'appliquer sur des animaux surnuméraires disponibles dans chaque groupe des protocoles spécifiques d'étude du neurocomportement, de neuropathologie, de neurochimie ou d'électrophysiologie susceptibles de compléter les résultats obtenus par les examens recommandés dans cette Ligne directrice (16)(19)(20)(21). Ces protocoles présentent un intérêt particulier dès lors que l'observation empirique, les effets escomptés ou le mécanisme ou le mode d'action présagent d'un type spécifique de neurotoxicité. Ces protocoles supplémentaires peuvent être appliqués aux mères aussi bien qu'aux petits. Il est également possible de recourir à d'autres protocoles *ex vivo* ou *in vitro*, sous réserve qu'ils n'altèrent pas l'intégrité des protocoles *in vivo*.

PREPARATIONS EN VUE DE L'ESSAI

Sélection de l'espèce animale

7. L'espèce animale expérimentale privilégiée est le rat ; d'autres espèces peuvent être utilisées, s'il y a lieu. Toutefois, il convient de noter que le nombre de jours de gestation et de développement post-natal spécifiés dans cette Ligne directrice correspond à des souches de rats couramment utilisées, et que des durées comparables devront être choisies dans le cas de l'utilisation d'une autre espèce ou d'une souche inhabituelle. L'emploi d'une autre espèce sera justifié par des données toxicologiques, pharmacocinétiques, et/ou d'une autre nature. La légitimation du choix doit s'appuyer sur des évaluations neurocomportementales et neuropathologiques postnatales déjà disponibles, spécifiques de l'espèce. Lorsqu'un essai antérieur a produit des résultats préoccupants, l'espèce ou la souche concernée doit être considérée. Les différentes souches de rat se caractérisent par des performances dissemblables et il convient donc de fournir les preuves démontrant que la souche sélectionnée présente une fécondité et une réactivité adéquates. La fiabilité et la sensibilité de la détection de la neurotoxicité pour le développement sur les autres espèces devront être documentées.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. La température du local abritant les animaux expérimentaux doit être de 22 ± 3 °C. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et, de préférence, elle n'excèdera pas 70 %, sauf pendant le nettoyage du local, mais il faut s'efforcer de la maintenir à 50-60 %. L'éclairage doit être artificiel, avec alternativement 12 heures de lumières et 12 heures d'obscurité. Il est possible d'inverser le cycle d'éclairage avant

l'accouplement et pendant la durée de l'étude, afin de procéder aux évaluations des effets fonctionnels et comportementaux pendant la période d'obscurité (sous lumière rouge), c'est-à-dire pendant la période d'activité normale des animaux (22). Toute modification du cycle lumière-obscurité doit inclure une période d'acclimatation suffisante pour l'adaptation des animaux aux nouvelles conditions. L'alimentation correspond à des régimes de laboratoire conventionnels avec accès illimité à l'eau de boisson. La nature des aliments et de l'eau sont consignés et la présence de contaminants doit y être analysée.

9. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages adaptées à cet usage. Dès confirmation de la copulation ou avant le 15^{ème} jour de gestation, les animaux fécondés doivent être placés individuellement dans des cages de mise bas ou de maternité. Cet équipement doit être aménagé pour réduire au minimum les éventuels effets de placement en cage. Les femelles fécondées disposeront de matériaux de nidification adéquats et bien définis aux abords de la mise bas. Il est notoire qu'une manipulation ou un stress superflu pendant la gestation peut provoquer des effets indésirables, notamment un avortement ou un développement foetal ou postnatal perturbé. Afin de se prémunir contre une mortalité foetale due à des facteurs non liés au traitement, il convient de manipuler avec soin les animaux pendant la gestation, et d'éviter tout stress exercé par des facteurs externes tels qu'un bruit excessif.

Préparation des animaux

10. Il faut utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire et n'ayant préalablement subi aucun traitement expérimental, à moins que l'étude ne soit incorporée dans une autre étude (voir paragraphe 3). Les animaux expérimentaux doivent être caractérisés en termes d'espèce, de souche, de source, de sexe, de poids et d'âge. Chaque animal doit être affecté et marqué d'un numéro d'identification individuel. Il convient de maintenir autant que possible une uniformité de poids et d'âge des animaux, dans tous les groupes de l'essai, et de se trouver dans la gamme de valeurs normales de l'espèce et de la souche étudiées. A chaque niveau de dose, il faut utiliser des animaux femelles nullipares adultes jeunes. Les individus d'une même fratrie ne peuvent pas être accouplés, et des précautions doivent être prises dans ce sens. Le jour de gestation (JG) 0 est le jour auquel on observe un bouchon vaginal et/ou des spermatozoïdes. Les animaux à gestation datée acquis auprès d'un fournisseur disposeront d'une période d'acclimatation adéquate (par exemple, 2-3 jours). Les femelles fécondées doivent être affectées sans biais aux groupes témoin et de traitement et, dès que possible, uniformément réparties dans les groupes (par exemple il est recommandé d'employer un protocole aléatoire stratifié pour uniformiser la répartition entre tous les groupes, notamment fondé sur le poids corporel). Les femelles inséminées par le même mâle doivent être également réparties dans les groupes.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

11. Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre suffisant de femelles gravides exposées à la substance de l'essai afin de garantir l'obtention d'un nombre adéquat de descendants pour évaluer la neurotoxicité. Un nombre total de 20 portées est recommandé pour chaque niveau de dose. Il est possible d'utiliser des modèles d'administration avec répétition des expériences et groupes échelonnés sous réserve que le nombre total de portées par groupe soit adéquat, et que des modèles statistiques appropriés soient utilisés pour tenir compte des expériences identiques.

12. Au jour 4 après la naissance (JAN 4) ou avant (le jour de la mise bas est JAN 0), la taille de chaque portée doit être ajustée en éliminant les petits en excès par sélection aléatoire pour que toutes les portées soient de taille identique (23). La taille de la portée ne doit pas dépasser la taille de portée moyenne pour la souche de rongeur utilisée (8-12). Les nombres de petits mâles et femelles doivent être aussi proches que possible de

l'égalité. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple, basée sur le poids corporel. Après standardisation des portées (restriction) et avant toute analyse des effets fonctionnels, chaque petit sur lequel on a programmé des essais pré-sevrage ou post-sevrage doit être identifié individuellement par une méthode humaine adéquate d'identification des petits (par exemple, 24).

Affectation des animaux aux essais fonctionnels et comportementaux, aux mesures de poids du cerveau et aux évaluations neuropathologiques

13. La Ligne directrice admet des approches diverses quant à la répartition des animaux exposés *in utero* et via l'allaitement dans les différents essais fonctionnels et comportementaux, la détermination de la maturité sexuelle et du poids du cerveau et d'évaluation neuropathologique (25). Il est possible d'ajouter d'autres essais sur la fonction neurocomportementale (par exemple, comportement social), ou des essais de neurochimie ou de neuropathologie, au cas par cas, sous réserve que l'intégrité des essais initiaux requis ne soit pas compromise.

14. Les petits sont sélectionnés pour chaque groupe de dose et affectés à une évaluation d'effet au JAN 4 ou après. La sélection des petits doit permettre, dans la mesure du possible, une représentation équilibrée des deux sexes de chaque portée, pour chaque groupe de dose, dans tous les essais. Dans le test d'activité motrice, il convient d'analyser la même paire de petits mâle et femelle à tous les âges pré-sevrage (voir paragraphe 35). Pour tous les autres essais, on peut affecter des paires identiques ou différentes d'animaux mâles et femelles aux différents essais comportementaux. Il est parfois nécessaire d'affecter des petits différents aux essais immatures versus adultes dans le cas de l'étude de la fonction cognitive, afin d'éviter toute confusion entre effets de l'âge et effets d'un précédent entraînement pour ces mesures (26)(27). Au moment du sevrage (JAN 21), les petits qui ne sont pas sélectionnés pour des tests peuvent être sacrifiés humainement. Toute modification de la répartition des petits doit être consignée. L'unité statistique de la mesure est la portée (ou la mère) et non le petit.

15. Il existe différentes façons de répartir les petits dans les examens pré-sevrage et post-sevrage, les essais cognitifs, les examens pathologiques, etc. (un modèle général est proposé à la Figure 1 et des exemples de répartition sont présentés dans l'appendice 1). Il est recommandé d'employer les nombres minimaux suivants d'animaux dans chaque groupe de dose pour les examens pré-sevrage et post-sevrage :

Observations cliniques et poids corporel	Tous les animaux
Observations cliniques détaillées	20/sexe (1/sexe/portée)
Poids du cerveau (post fixation) JAN 11-22	10/sexe (1/portée)
Poids du cerveau (non fixé) ~ JAN 70	10/sexe (1/portée)
Neuropathologie (fixation par immersion ou perfusion) JAN 11-22	10/sexe (1/portée)
Neuropathologie (fixation par perfusion) JAN ~70	10/sexe (1/portée)
Maturité sexuelle	20/sexe (1/sexe/portée)
Autres marqueurs du développement (en option)	Tous les animaux
Ontogénie comportementale	20/sexe (1/sexe/portée)
Activité motrice	20/sexe (1/sexe/portée)
Fonction motrice et sensorielle	20/sexe (1/sexe/portée)
Apprentissage et mémoire	10/sex ^a (1/portée)

a) Selon la sensibilité des essais de fonction cognitive, il faut parfois envisager d'étudier un plus grand nombre d'animaux, par exemple 1 mâle et 1 femelle par portée (pour la répartition des animaux, se reporter à l'Appendice 1) (d'autres recommandations sur la taille de l'échantillon sont fournies dans le Document d'orientation (8)).

Dosage

16. On doit utiliser au moins trois niveaux de doses différents et un groupe témoin en parallèle. Les niveaux de dose doivent être espacés de façon à produire une gradation des effets toxiques. Si elle n'est pas limitée par les propriétés physico-chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit être choisie en vue d'induire une certaine toxicité pour la mère (par exemple signes cliniques, diminution du gain de poids corporel (pas plus de 10%) et/ou preuve de toxicité limitée par la dose dans un organe cible). La dose élevée ne doit pas dépasser 1000 mg/kg/jour de poids corporel, sauf exception, par exemple, si l'exposition humaine prévue indique qu'il est nécessaire d'utiliser une dose plus élevée. Il est également possible de mener des études pilotes ou des études préliminaires de détermination d'un ordre de grandeur afin de définir la dose la plus élevée qu'il faut utiliser pour produire une toxicité minimale pour la mère. Lorsque la substance d'essai s'est révélée toxique au plan du développement dans une étude standard de toxicité pour le développement ou dans une étude pilote, la dose la plus élevée doit être la dose maximale qui n'induit pas de toxicité excessive pour la descendance, ni de mort *in utero* ou néonatale, ni de malformations, qui empêcherait une évaluation significative de la neurotoxicité. La dose la plus faible ne doit produire aucun signe de toxicité pour la mère ni de toxicité pour le développement, notamment de neurotoxicité. Il convient de sélectionner une séquence de doses décroissantes en vue de mettre en évidence une relation dose-effet et une concentration sans effet nocif observé (CSENO), ou des doses proches de la limite de détection permettant de déterminer un niveau de référence. Les intervalles optimaux au sein d'une séquence de doses décroissantes sont souvent d'un facteur de 2 à 4 et l'adjonction d'un quatrième groupe de dose est souvent préférable à l'administration de doses très espacées (par exemple, par un facteur de plus de 10).

17. Il convient de choisir des niveaux de dose en considérant toutes les données existantes sur la toxicité ainsi que d'autres informations sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de composés apparentés. Ces informations contribueront également à justifier l'échelle des doses. Il faut envisager l'administration directe aux petits en se fondant sur des informations relatives à l'exposition et à la pharmacocinétique (28)(29). Il faudra soigneusement évaluer les avantages et les inconvénients avant la mise en œuvre d'études d'administration directe (30).

18. Le groupe témoin étudié en parallèle doit être un groupe témoin fictivement traité ou un groupe témoin traité par le véhicule, lorsqu'un véhicule est utilisé pour administrer la substance d'essai. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule, rapporté au poids corporel. Lorsqu'un véhicule ou un autre adjuvant est utilisé pour faciliter l'administration, il convient de tenir compte des caractéristiques suivantes : effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme, ou la rétention de la substance d'essai ; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier ses caractéristiques toxiques ; et effets sur la consommation d'aliments ou d'eau ou le statut nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit provoquer aucun effet susceptible d'interférer avec l'interprétation de l'étude, et ne doit induire aucune toxicité au plan neurocomportemental, ni exercer d'effets sur la reproduction ou le développement. Dans le cas de l'utilisation de nouveaux véhicules, il convient d'inclure dans l'étude, outre le groupe véhicule témoin, un groupe témoin fictivement traité. Les animaux inclus dans le ou les groupes témoins doivent être manipulés exactement comme les animaux des groupes d'essai.

Administration des doses

19. La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés par la voie la plus représentative de l'exposition humaine potentielle, en fondant le choix sur des informations disponibles sur le métabolisme et la distribution dans les animaux expérimentaux. La voie d'administration sera généralement orale (par exemple, gavage, aliments, ou eau de boisson), mais il est possible d'utiliser d'autres voies (par exemple, voie cutanée, inhalation), justifiées par des caractéristiques particulières ou des voies d'exposition de l'homme envisagées ou connues (d'autres informations sont fournies dans Document d'orientation 43 (8)). Il convient de motiver le

choix de la voie d'administration. La substance d'essai doit être administrée tous les jours environ au même moment.

20. La dose administrée à chaque animal dépend normalement de la mesure la plus récente du poids corporel du sujet. Toutefois, les doses devront être ajustées avec précautions dans le dernier tiers de la gestation. Si une toxicité excessive est observée sur les mères traitées, elles seront humainement sacrifiées.

21. La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés au minimum quotidiennement aux femelles fécondées à partir du moment de l'implantation (JG 6) et jusqu'à la fin de la lactation (JAN 21), de façon à exposer les petits à la substance d'essai pendant le développement neurologique prénatal et postnatal. L'âge au début de l'administration et la durée et la fréquence des administrations peuvent être ajustés, s'il est démontré qu'un autre modèle expérimental correspond mieux aux expositions de l'homme. Les durées d'administration doivent être adaptées aux autres espèces de façon à garantir une exposition pendant toutes les périodes précoces du développement du cerveau (c'est-à-dire équivalentes à la croissance cérébrale humaine prénatale et postnatale précoce). Les administrations peuvent être initiées au début de la gestation (JG 0), bien qu'il convienne d'envisager que la substance d'essai puisse entraîner une perte pré-implantatoire. Le choix d'une administration à partir du JG 6 permettrait d'écartier ce risque, mais les stades du développement compris entre JG 0 et 6 ne seraient alors pas traités. Il est impossible de commencer l'administration à JG 0 sur des animaux à accouplement daté acquis par le laboratoire, et JG 6 semble par conséquent un bon compromis de jour de départ. Le laboratoire d'essai prendra soin d'ajuster le régime posologique conformément aux informations pertinentes dont il dispose sur les effets de la substance d'essai, avant l'expérience, et conformément à des considérations logistiques, notamment par le prolongement de l'administration après le sevrage. Il est préférable d'interrompre l'administration le jour de la parturition chez les animaux qui n'ont pas mis bas tous leurs descendants. On estime en général que les petits sont exposés par l'intermédiaire du lait maternel ; toutefois, l'administration directe aux petits doit être envisagée dans les cas d'absence de preuve d'une exposition continue de la progéniture. Ces preuves peuvent être tirées, par exemple, d'informations pharmacocinétiques, de toxicité sur la progéniture ou de modification des marqueurs biologiques (28).

OBSERVATIONS

Observations des mères

22. La condition sanitaire de toutes les mères, notamment la morbidité et la mortalité, doit être attentivement observée au moins une fois par jour.

23. Pendant les périodes de traitement et d'observation, des examens cliniques plus détaillés sont périodiquement menés (au moins deux fois pendant la période d'administration au cours de la gestation et deux fois pendant la période d'administration au cours de la lactation), en employant au moins dix mères par dose. Les animaux doivent être observés à l'extérieur de leur cage d'habitation, par des techniciens formés ignorant du traitement des animaux, et suivant des protocoles normalisés visant à limiter autant que possible les biais liés au stress des animaux, à l'observateur, et à optimiser la reproductibilité inter-observateurs. Dans la mesure du possible, il est préférable que toutes les observations d'une étude donnée soient réalisées par le même technicien.

24. La présence de signes observés doit être consignée. Autant que possible, leur ampleur doit également être notée. Les observations cliniques incluront, sans s'y limiter, des modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, la présence de sécrétions, et l'activité autonome (par exemple, larmoiement, horripilation, taille des pupilles, mode de respiration inhabituel, et /ou respiration par la bouche, et tous signes inhabituels de miction ou défécation).

25. Il faut également noter toutes les réponses inhabituelles relatives à la position du corps, à l'intensité de l'activité (par exemple, augmentation ou diminution de l'exploration de la zone standard) et à la coordination des mouvements. Les changements de démarche (par exemple marche en canard, ataxie), de posture (par exemple dos rond) et de réactivité à la manipulation, à la pose ou à d'autres stimuli environnementaux, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de convulsions, de tremblements, de stéréotypies (par exemple toilettage excessif, mouvements inhabituels de la tête, déplacements répétés en cercle), de comportements étranges (par exemple, morsures ou léchage excessifs, auto-mutilation, marche à reculons, vocalisation), ou d'agression doivent être enregistrés.

26. Les signes de toxicité doivent être enregistrés, notamment le jour de leur apparition, le moment de la journée, leur degré et leur durée.

27. Les animaux sont pesés au moment de l'administration au moins une fois par semaine pendant toute l'étude, ou le jour de la mise bas ou à un moment proche de ce jour et à JAN 21 (sevrage). Dans les études par gavage, les mères doivent être pesées au moins deux fois par semaine. Les doses sont ajustées au moment de chaque pesée, s'il y a lieu. La consommation d'aliments est mesurée une fois par semaine au moins pendant la gestation et la lactation. La consommation d'eau doit être mesurée au moins une fois par semaine si les animaux sont exposés par l'eau de boisson.

Observations de la progéniture

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

29. Pendant les périodes de traitement et d'observation, des examens cliniques plus détaillés des descendants doivent être réalisés. La progéniture (au moins un petit/sexe/portée) doit être observée par des techniciens formés ignorant du traitement des animaux, suivant des protocoles normalisés visant à réduire au minimum les biais et à optimiser la reproductibilité inter-observateurs. Dans la mesure du possible, il est préférable que les observations soient réalisées par le même technicien. On contrôlera au minimum les effets décrits dans les paragraphes 24 et 25, s'ils s'appliquent au stade du développement étudié.

30. Tous les signes de toxicité sur la progéniture doivent être consignés, notamment le jour de leur apparition, le moment de la journée, leur degré et leur durée.

Marqueurs physiques et développementaux

31. Les modifications des marqueurs du développement antérieurs au sevrage (par exemple, dépliement du pavillon de l'oreille, ouverture des yeux, poussée des incisives) sont étroitement corrélées au poids corporel (30)(31). Le poids corporel est donc souvent le meilleur indicateur du développement physique. Il est par conséquent recommandé de mesurer les marqueurs de développement uniquement lorsque les indices préalables suggèrent que ces données fourniront de nouvelles informations. Le calendrier d'évaluation de ces paramètres est indiqué dans le Tableau 1. En se fondant sur les effets anticipés et les résultats des mesures initiales, il peut être judicieux d'ajouter d'autres dates d'examen ou de réaliser les mesures à d'autres stades du développement.

32. Il est préférable d'utiliser l'âge post-coïtal plutôt que l'âge postnatal pour évaluer le développement physique (33). Le jour du sevrage, il est recommandé d'examiner les petits avant sevrage réel pour éviter toute confusion avec l'effet du stress associé au sevrage. De surcroît, on ne procédera à aucun examen post-sevrage des petits au cours des deux jours qui suivent cet événement.

Tableau 1 : Calendrier d'évaluation des marqueurs physiques et développementaux, et des effets fonctionnels/comportementaux (a).

Effets \ Ages	Pré-sevrage (b)	Adolescence (b)	Jeunes adultes (b)
Marqueurs physiques et développementaux			
Poids corporel et observations cliniques	hebdomadaire (c)	au moins toutes les deux semaines	au moins toutes les deux semaines
Poids du cerveau	JAN 22 (j)		à la fin
Neuropathologie	JAN 22 (j)		à la fin
Maturité sexuelle	--	en temps opportun	--
Autres marqueurs du développement	s'il y a lieu	--	--
Effets fonctionnels / comportementaux			
Ontogénie comportementale	au moins deux mesures		
Activité motrice (y compris accoutumance)	1-3 fois (f)	--	une fois
Fonction motrice et sensorielle	--	une fois	une fois
Apprentissage et mémoire	--	une fois	une fois

a) Ce tableau présente le nombre minimum de mesures à réaliser. En fonction des effets anticipés et des résultats des mesures initiales, il peut être judicieux d'ajouter d'autres dates d'examen (par exemple sur animaux âgés) ou de réaliser les mesures à d'autres stades du développement.

b) Il est recommandé de suspendre l'essai sur les petits pendant les deux jours qui suivent le sevrage (voir paragraphe 32). Les dates suivantes sont conseillées pour les essais sur adolescents : apprentissage et mémoire = JAN 25±2 ; fonction motrice et sensorielle = JAN 25±2. Les âges recommandés pour les essais sur jeunes adultes sont JAN 60-70.

c) Il convient de mesurer les masses corporelles au moins deux fois par semaine dans le cas d'une administration directe sur les petits afin d'ajuster les doses pendant la période de gain de masse corporelle rapide.

d) Le poids du cerveau et la neuropathologie peuvent être évalués plus tôt (par exemple JAN 11), si nécessaire (voir paragraphe 39).

e) Le cas échéant, d'autres marqueurs du développement, outre le poids corporel (par exemple ouverture des yeux), seront consignés (voir paragraphe 31).

f) Voir paragraphe 35.

33. Les petits vivants doivent être comptés et sexé, par exemple, par examen visuel ou mesure de la distance ano-génitale (34) (35), et chaque petit d'une portée doit être pesé individuellement à la naissance ou peu après, au moins une fois par semaine pendant l'allaitement, et au moins toutes les deux semaines par la suite. Pour évaluer la maturité sexuelle, il faut déterminer l'âge et la masse corporelle de l'animal à l'apparition de la perméabilité vaginale (36) ou de la séparation prépucciale (37) sur au moins un mâle et une femelle par portée.

Ontogénie comportementale

34. L'ontogénie des comportements sélectionnés doit être mesurée sur au moins un petit/sexe/portée pendant la période correspondant à l'âge adéquat, et sur les mêmes petits à toutes les dates de l'essai pour tous les comportements évalués. Il convient d'espacer uniformément les dates de mesure sur cette période, afin de déterminer si le changement de l'ontogénie de ce comportement est normal ou lié au traitement (38). Quelques exemples de comportements susceptibles de donner lieu à une évaluation de l'ontogénie sont les suivants : réflexe de redressement, géotaxie négative et activité motrice (38)(39)(40).

Activité motrice

35. L'activité motrice doit être suivie (41)(42)(43)(44)(45) pendant la période préalable au sevrage et à l'âge adulte. La mise en œuvre de l'essai au moment du sevrage est décrite au paragraphe 32. La longueur de la session d'essai doit permettre de démontrer l'accoutumance intra-session des témoins non traités. Il est vivement recommandé d'utiliser l'activité motrice pour évaluer l'ontogénie comportementale. Dans un essai d'ontogénie comportementale, il faut utiliser les mêmes animaux dans toutes les sessions d'essai préalables au sevrage. Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour permettre d'évaluer l'ontogénie de l'accoutumance intra-session (44). A cet effet, l'essai peut demander trois examens ou davantage avant le sevrage, jour du sevrage compris (par exemple, JAN 13, 17, 21). Il convient également d'analyser les mêmes animaux, ou des animaux de la fratrie, à l'âge adulte vers la fin de l'étude (par exemple, à JAN 60-70). Si nécessaire, des dates d'essai peuvent être ajoutées. L'activité motrice doit être contrôlée par un appareil d'enregistrement automatique capable de détecter aussi bien des augmentations que des diminutions d'activité (c'est-à-dire que l'activité de base mesurée par le dispositif ne doit pas être trop modérée, ce qui empêcherait la détection des diminutions d'activité, ni trop élevée, ce qui empêcherait la détection d'augmentations). Tous les appareils seront testés par des protocoles standard afin de garantir, dans la mesure du possible, la reproductibilité entre appareils et entre dates de mesure. Il conviendra d'équilibrer au mieux les groupes de traitement affectés à chaque appareil. Chaque animal doit être testé individuellement. Il faut répartir les groupes d'évaluation de l'essai sur la journée pour tenir compte des rythmes d'activité circadiens. On s'attachera particulièrement à réduire au minimum les variations affectant les conditions de l'essai et d'éviter leur liaison systématique au traitement. Les variables susceptibles d'affecter de nombreuses mesures du comportement, notamment l'activité motrice, comprennent l'intensité du bruit, les dimensions et la forme de la cage de l'essai, la température, l'humidité relative, les conditions lumineuses, les odeurs, l'utilisation de la cage la cage d'habitation pour les tests ou d'une nouvelle cage d'essai et les distractions dues à l'environnement.

Fonction motrice et sensorielle

36. Les fonctions motrices et sensorielles doivent être étudiées en détail au moins une fois pendant la période de l'adolescence et une fois à l'âge jeune adulte (par exemple, JAN 60-70). Pour procéder aux essais au moment du sevrage, se reporter au paragraphe 32. Il convient de mener les expériences en nombre suffisant pour garantir un échantillonnage quantitatif approprié des modalités sensorielles (par exemple, somato-sensorielle, vestibulaire) et des fonctions motrices (par exemple, force, coordination). La réponse à la poussée (46), le réflexe de redressement (47) (48), l'accoutumance au sursaut auditif (40) (49) (50) (51) (52)

(53) (54), et les potentiels évoqués (55) comptent parmi les exemples de tests des fonctions motrices et sensorielles.

Essais d'apprentissage et de mémoire

37. Un essai d'apprentissage associatif et de mémoire doit être mené après le sevrage (par exemple 25±2 jours) et chez les jeunes adultes (JAN 60 et plus). Pour ce qui est de l'essai au moment du sevrage, on se reportera au paragraphe 32. Il est possible d'utiliser des essais identiques ou différents aux deux stades de développement. Le choix du ou des essais d'apprentissage et de mémoire chez les rats sevrés et adultes reste relativement libre, mais les tests doivent satisfaire deux critères. Tout d'abord, l'apprentissage doit être évalué soit comme un changement au cours de plusieurs tests ou sessions répétées d'apprentissage, ou bien, dans des essais mettant en œuvre un seul test, par référence à une condition expérimentale qui contrôle les effets non associatifs de l'entraînement. De plus, le ou les essais doivent inclure une mesure de la mémoire (à court terme ou à long terme) en plus de l'apprentissage initial (acquisition), mais cette mesure de mémoire n'a pas lieu d'être rapportée si une mesure d'acquisition n'a pas été obtenue dans le même essai. Dans le cas où le ou les essais d'apprentissage et de mémoire démontrent un effet de la substance d'essai, il convient d'envisager l'utilisation d'autres tests visant à éliminer toute interprétation fondée sur des altérations des capacités sensorielles, de motivation et/ou motrices. Outre ces deux critères, il est recommandé de choisir l'essai d'apprentissage et de mémoire en tenant compte de sa sensibilité démontrée à la classe de composés à l'étude, dans la mesure où cette information est disponible dans la littérature. Si elle ne l'est pas, la liste ci-dessous propose des tests qui peuvent être réalisés pour satisfaire aux critères mentionnés plus haut dans ce paragraphe : test d'évitement passif (43)(56)(57), appariement retardé de la position pour le rat adulte (58) et pour le rat avant sevrage (59), conditionnement olfactif (43)(60), labyrinthe d'eau de Morris (61)(62)(63), labyrinthe de Biel ou de Cincinnati (64)(65), labyrinthe à bras radiaux (66), labyrinthe en T (43), acquisition et rétention d'un comportement programmé (26)(67)(68). D'autres essais décrits dans la littérature s'appliquent aux rats sevrés (26)(27) et adultes (19)(20).

Autopsie

38. Les mères peuvent être euthanasiées après sevrage de leur progéniture.

39. L'évaluation neuropathologique des descendants sera menée sur des tissus prélevés sur des animaux humainement sacrifiés au JAN 22 ou plus tôt dans l'étude entre JAN 11 et JAN 22, et également à la fin de l'étude. Les tissus cérébraux doivent être examinés sur les petits sacrifiés jusqu'au JAN 22 ; sur les animaux sacrifiés à la fin de l'étude, on évaluera les tissus du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP). Les tissus des animaux sacrifiés au JAN 22 ou plus tôt peuvent être fixés par immersion ou perfusion. Ceux des animaux tués à la fin de l'étude doivent être fixés par perfusion. Tous les aspects de la préparation des échantillons de tissus, de la perfusion des animaux à la dissection des échantillons de tissus, traitement des tissus et coloration des lames, devront se conformer à un modèle expérimental équilibré tel que chaque lot contienne des échantillons représentatifs de chaque groupe de dose. Le Document d'orientation No. 20 (9), contient des informations supplémentaires sur la neuropathologie. Voir également (103).

Traitement des échantillons de tissus

40. Toutes les anomalies macroscopiques évidentes au moment de l'autopsie doivent être consignées. Les échantillons de tissus prélevés doivent représenter les principales régions du système nerveux. Les échantillons sont conservés dans un fixateur approprié et traités en suivant des protocoles histologiques publiés normalisés (69)(70)(71)(103). L'inclusion dans la paraffine est acceptée pour les tissus du SNC et du SNP, mais l'utilisation d'osmium lors de la post-fixation, associée à des inclusions dans une résine époxy, convient parfois mieux lorsqu'un degré plus élevé de résolution est requis (par exemple, pour les nerfs périphériques, en

cas de suspicion d'une neuropathie périphérique ou pour une analyse morphométrique des nerfs périphériques). Les tissus cérébraux prélevés à des fins d'analyse morphométrique doivent être inclus dans un milieu approprié, simultanément pour toutes les doses, afin d'éviter les artefacts de rétrécissement parfois associés à un stockage prolongé dans le fixateur (6).

Examen neuropathologique

41. L'examen qualitatif a les objectifs suivants :

- i) identifier les régions du système nerveux présentant des indices d'altérations neuropathologiques ;
- ii) identifier les types d'altérations neuropathologiques provoqués par l'exposition à la substance d'essai ; et,
- iii) évaluer la gravité des altérations neuropathologiques.

Des coupes histologiques représentatives des échantillons de tissus doivent être examinées au microscope par un pathologiste de formation adéquate afin de détecter des altérations neuropathologiques. Toutes les altérations détectées seront caractérisées par un degré de gravité subjectif. Une coloration hématoxyline et éosine suffisent souvent pour évaluer les coupes de cerveau des animaux humainement sacrifiés à JAN 22 ou plus tôt. Toutefois, une coloration de la myéline (par exemple fast blue luxol / violet de crésyl) et une coloration à l'argent (par exemple colorations de Bielschowsky ou de Bodians) sont recommandées pour les coupes de tissus du SNC et du SNP prélevés sur les animaux sacrifiés à la fin de l'étude. Le pathologiste appréciera, en s'appuyant sur son expérience professionnelle et sur la nature des altérations observées, s'il convient d'utiliser d'autres colorations afin d'identifier et de caractériser des types d'altérations particuliers (par exemple, protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) ou histochimie de la lectine pour estimer les altérations gliales et microgliales (72), fluoro-jade pour détecter les nécroses (73)(74), ou coloration à l'argent spécifique de la dégénérescence neurale (75)).

42. Il convient d'effectuer une évaluation morphométrique (quantitative), car ces données peuvent contribuer à détecter un effet lié au traitement et sont utiles à l'interprétation des différences liées au traitement au niveau du poids du cerveau ou de la morphologie (76)(77). Des échantillons de tissu nerveux sont prélevés et préparés en vue d'une évaluation morphométrique. Il faut inclure, par exemple, des mesures linéaires ou surfaciques de régions spécifiques du cerveau (78). De telles mesures se pratiquent sur des coupes homologues soigneusement sélectionnées grâce à des repères microscopiques fiables (6). La stéréologie peut permettre d'identifier des effets liés au traitement sur des paramètres tels que le volume ou le nombre de cellules spécifiques de régions neuroanatomiques (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. On recherchera par l'examen des cerveaux tous les indices d'altérations neuropathologiques associés au traitement, sur des échantillons adéquats prélevés dans les principales régions du cerveau (par exemple, bulbes olfactifs, cortex cérébral, hippocampe, noyaux basaux, thalamus, hypothalamus, mésencéphale (tectum, calotte, pédoncules cérébraux), pont, bulbe rachidien, cervelet), en s'efforçant de procéder à un examen exhaustif. Il est important que les coupes soient prélevées dans le même plan sur tous les animaux. Sur les adultes humainement sacrifiés à la fin de l'étude, il faut prélever des sections représentatives de la moelle épinière et du SNP. Les zones étudiées doivent comprendre l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière au niveau des renflements cervicaux et lombaires, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au niveau du genou), et les ramifications du nerf tibial au niveau des muscles du mollet. La moelle épinière et les nerfs périphériques doivent être représentées par des sections transversales et longitudinales.

44. L'évaluation neuropathologique doit comprendre un examen permettant de détecter des indices de dommages affectant le développement du système nerveux (6)(85)(86)(87)(88)(89), en plus des altérations

cellulaires (par exemple, vacuolisation neuronale, dégénérescence, nécrose) et des modifications tissulaires (par exemple, gliose, infiltration leucocytaire, formation de kystes). A cet égard, il est important de distinguer les effets liés au traitement, des événements normaux du développement qui surviennent habituellement au stade correspondant au moment du sacrifice (90). Quelques exemples d'altérations significatives, indicatrices d'effets préjudiciables au développement sont cités ci-dessous :

- modification des dimensions ou de la forme des bulbes olfactifs, des hémisphères cérébraux ou du cervelet au niveau macroscopique ;
- modification des dimensions relatives des diverses régions du cerveau, notamment augmentations ou diminutions de la taille des régions s'expliquant par une perte ou une persistance de populations normalement transitoires de cellules ou de projections axoniques (par exemple, couche germinale externe du cervelet, corps calleux) ;
- modifications de la prolifération, de la migration, et de la différenciation, révélées par des zones d'apoptose ou nécrose excessives, de populations groupées ou dispersées de neurones ectopiques, désorientés ou malformés ou d'altérations des dimensions relatives des diverses couches de structures corticales ;
- modifications des modèles de myélinisation, notamment réduction de la taille globale ou modification de la coloration des structures myélinisées ;
- indice d'hydrocéphalie, en particulier grossissement des ventricules, sténose de l'aqueduc de Sylvius et amincissement des hémisphères cérébraux ;

Analyses des relations dose-réponse des altérations neuropathologiques

45. Le protocole suivant est recommandé pour les analyses neuropathologiques qualitatives et quantitatives. Il s'agit d'un protocole par étapes. Premièrement, on compare des coupes du groupe de dose la plus élevée avec celles du groupe témoin. En l'absence d'observations d'altérations neuropathologiques chez les animaux du groupe de dose élevée, aucune autre analyse n'est requise. Si des preuves d'altérations neuropathologiques sont notées dans ce groupe, les animaux des groupes de doses intermédiaire et faible sont examinés. Si l'étude sur le groupe de dose élevée est interrompue par le décès ou l'observation d'une toxicité parasite sur les animaux, il faut rechercher dans les groupes de dose élevée et intermédiaire des altérations neuropathologiques. Si l'on détecte des signes de neurotoxicité dans les groupes de doses inférieures, il convient de mener l'analyse neuropathologique dans ces groupes. Pour toute altération neuropathologique liée au traitement, observée lors des examens qualitatifs ou quantitatifs, il faudra déterminer la nature dose-dépendante de l'incidence, de la fréquence et du degré de gravité des lésions ou des altérations morphométriques, en se basant sur une évaluation de tous les animaux de tous les groupes de doses. Toutes les régions du cerveau présentant un signe quelconque d'altération neuropathologique doivent être incluses dans cette évaluation. Il conviendra, pour chaque type de lésion, de décrire les caractéristiques choisies pour définir les différents degrés de gravité, en indiquant les critères employés pour différencier chaque degré. La fréquence de chaque type de lésion et son degré de gravité doivent être enregistrés et une analyse statistique permettra d'évaluer la nature de la relation dose-réponse. L'utilisation de lames codées est recommandée (91).

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

46. Les données doivent être rapportées individuellement et résumées sous forme de tableau, présentant pour chaque groupe d'essai les types de modification et le nombre de mères, de descendants par sexe, et de

portées présentant chaque type de modification. Dans le cas d'une exposition post-natale des petits, la voie, la durée et la période d'exposition doivent être indiquées.

Evaluation et interprétation des résultats

47. L'objectif d'une étude de neurotoxicité développementale est de fournir des informations sur les effets d'une exposition répétée à une substance pendant le développement *in utero* et post-natal précoce. L'étude est axée tant sur la toxicité générale que sur les effets neurotoxiques sur le développement, et c'est pourquoi les résultats de l'étude devront permettre de distinguer les effets neurodéveloppementaux qui apparaissent en l'absence de toxicité maternelle générale de ceux qui ne sont exprimés qu'à des doses également toxiques pour la mère. La complexité des interrelations entre le modèle de l'étude, l'analyse statistique et la signification biologique des résultats exige l'avis d'un expert pour assurer une interprétation correcte des données de neurotoxicité pour le développement (107)(109). L'interprétation des résultats de l'essai observera une approche basée sur le poids de la preuve (20)(92)(93)(94). Il conviendra de discuter les types d'effets comportementaux ou morphologiques observés, s'ils existent, ainsi que les preuves d'une relation dose-réponse. Cette caractérisation doit inclure les données issues de toutes les études d'évaluation de la neurotoxicité pour le développement, en particulier des études épidémiologiques sur l'homme ou des rapports d'études de cas et des études sur animaux expérimentaux (par exemple données toxicocinétiques, informations sur la relation structure-activité, données issues d'autres études de toxicité). Ceci comprend aussi les relations entre les doses de la substance d'essai et la présence ou l'absence, l'incidence et l'ampleur d'effets neurotoxiques quels qu'ils soient sur chaque sexe (20)(95).

48. L'évaluation des résultats comprendra une discussion analysant la signification biologique et la signification statistique. L'analyse statistique doit être considérée comme un outil orientant l'interprétation des données sans la déterminer totalement. Une signification statistique ne permet pas de conclure à elle seule, si elle est nulle, à l'absence d'effet lié au traitement, ni, si elle est positive, à un effet lié au traitement. Afin de se prémunir contre l'observation d'éventuels faux négatifs et contre les difficultés inhérentes à la "démonstration d'un résultat négatif," il conviendra d'inclure dans la discussion des données de témoins positifs et historiques, en particulier dans le cas d'absence d'effets liés au traitement (102)(106). La probabilité d'obtention de faux positifs doit faire l'objet d'une analyse dans le cadre de l'évaluation statistique générale des résultats (96). L'évaluation doit inclure, le cas échéant, la relation entre les altérations neuropathologiques et comportementales observées.

49. Tous les résultats devront être analysés en utilisant des modèles statistiques adaptés au protocole expérimental (108). Le choix d'une analyse paramétrique ou non paramétrique doit être justifié en tenant compte de facteurs tels que la nature des données (transformées ou non) et leur distribution, mais aussi de la robustesse relative de l'analyse statistique utilisée. Le choix des analyses statistiques doit être guidé par l'objectif et le modèle de l'étude de façon à limiter autant que possible les erreurs Type I (faux positifs) et Type II (faux négatifs) (96)(97)(104)(105). Si les études sur le développement font appel à des espèces multipares dans lesquelles plusieurs petits par portée sont soumis à l'essai, la portée doit être incluse dans le modèle statistique pour éviter l'accroissement des taux d'erreurs Type I (98)(99)(100)(101). L'unité statistique de la mesure doit alors être la portée et non le petit. Les modèles expérimentaux doivent éviter le traitement d'individus de la même portée dans des observations indépendantes. Des effets mesurés à plusieurs reprises sur le même sujet, quels qu'ils soient, doivent être analysés à l'aide de modèles statistiques qui tiennent compte de la non-indépendance de ces mesures.

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après :

Substance d'essai :

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques ;
- données permettant son identification, notamment source ;
- pureté de la préparation, et impuretés connues et/ou éventuelles.

Véhicule (le cas échéant) :

- justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit ni d'eau ni d'une solution saline physiologique.

Animaux expérimentaux :

- espèces et souches utilisées, et justification si choix d'une autre espèce que le rat ;
- fournisseur des animaux expérimentaux ;
- nombre, âge au début de l'essai, et sexe des animaux ;
- source, conditions d'hébergement, régime alimentaire, eau, etc. ;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales :

- justification du choix des doses ;
- justification de la voie et de la période d'administration ;
- précisions sur les doses administrées, notamment détails sur le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée ;
- précisions sur la formulation de la substance d'essai et la préparation des aliments, concentration finale, stabilité et homogénéité de la préparation ;
- méthode utilisée pour l'identification individuelle des mères et des descendants ;
- description détaillée du ou des protocoles de randomisation employés pour affecter les mères aux groupes de traitement, pour sélectionner les petits éliminés de la portée, et affecter les petits aux groupes d'essai ;
- précisions sur l'administration de la substance d'essai ;
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans les aliments, l'eau de boisson ou le dispositif d'inhalation en dose réelle (mg/kg de masse corporelle/jour), si possible ;
- conditions environnementales ;
- précisions sur la qualité des aliments et de l'eau (par exemple, eau du robinet, eau distillée) ;
- dates de début et de fin de l'étude.

Protocoles d'observation et d'essai :

- description détaillée des protocoles utilisés pour standardiser les observations et les protocoles, ainsi que définitions du mode opératoire de notation des observations ;
- liste de tous les protocoles d'essai utilisés, et justification de leur choix ;
- précisions sur les protocoles d'études comportementales et fonctionnelles, pathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques employés, y compris des informations et des détails sur les appareils automatiques ;
- protocoles d'étalonnage et de vérification de l'équivalence des appareils et de répartition équilibrée des groupes de traitement dans les protocoles d'essai ;
- brève justification explicitant toutes les décisions impliquant une appréciation professionnelle.

Résultats (par individu et dans une synthèse, notamment moyenne et variance, le cas échéant) :

- nombre d'animaux au début de l'étude et nombre à la fin de l'étude ;
- nombre d'animaux et de portées utilisés pour chaque méthode d'essai ;
- numéro d'identification de chaque animal et de la portée à laquelle il appartient ;
- effectif de la portée et poids moyen à la naissance par sexe ;
- résultats de poids corporel et de variation du poids corporel, y compris poids corporel final pour les mères et les petits ;
- données sur la consommation d'aliments et la consommation d'eau, s'il y a lieu (par exemple, si la substance chimique est administrée par l'intermédiaire de l'eau) ;
- résultat de réponse toxique par sexe et dose, notamment signes de toxicité ou de mortalité, y compris le moment et la cause du décès, le cas échéant ;
- nature, gravité, durée, jour de la survenue, moment de la journée, et évolution ultérieure des observations cliniques détaillées ;
- notation de chaque marqueur du développement (poids, maturité sexuelle et ontogénie comportementale) à chaque moment d'observation ;
- description détaillée de toutes les observations de comportement, fonctionnelles, neuropathologiques, neurobiologiques, électrophysiologiques par sexe, y compris augmentations et diminutions par rapport au témoin ;
- observations à l'autopsie ;
- poids des cerveaux ;
- tout diagnostic, déduit des signes et des lésions neurologiques, y compris les maladies ou les conditions naturelles ;
- images des observations représentatives ;
- images à faible grossissement permettant d'évaluer l'homologie des coupes utilisées pour la morphométrie ;
- données d'absorption et de métabolisme, notamment données complémentaires issues d'une étude toxicocinétique séparée, si elle est disponible ;
- traitement statistique des résultats, notamment modèles statistiques employés pour analyser les données, et résultats, qu'ils soient significatifs ou non ;
- liste du personnel impliqué dans l'étude, mentionnant leur formation professionnelle.

Discussion des résultats :

- information sur la relation dose - réponse, par sexe et groupe ;
- lien entre chaque effet toxique et la conclusion proposée sur le potentiel neurotoxique du produit chimique de l'essai, par sexe et groupe ;
- répercussions de toutes les informations toxicocinétiques sur les conclusions ;
- similitudes des effets observés avec ceux de tous les neurotoxiques connus ;
- données démontrant la fiabilité et la sensibilité de la méthode de l'essai (c'est-à-dire, résultats des témoins positifs et historiques) ;
- relations éventuelles entre les effets neuropathologiques et fonctionnels ;
- CSENO ou dose de référence pour les mères et les petits, par sexe et groupe.

Conclusions :

- discussion sur l'interprétation générale fondée sur les résultats, incluant une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une neurotoxicité pour le développement, et indiquant la CSENO.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (1995) Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Danemark, 13-14 juin 1995.
2. US EPA (1998) U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
3. US EPA (1998) Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
4. Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
5. Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
6. Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
7. OCDE (2003) Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., EUA, 23-25 octobre 2000.
8. OCDE (projet) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Draft Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OCDE, Paris. Disponible sur : [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
9. OCDE (2003) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OCDE, Paris, septembre 2003. Disponible sur : [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
10. Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
11. Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
12. Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
13. Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14. OCDE (1983) Ligne directrice pour les essais 415. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Etude de toxicité pour la reproduction sur une génération. Disponible sur : [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
15. OCDE (2001) Ligne directrice pour les essais 416. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Etude de toxicité pour la reproduction sur deux générations. Disponible sur : [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
16. OCDE (1997) Ligne directrice pour les essais 424. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Etude de neurotoxicité du développement. Disponible sur : [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
17. OCDE (2001) Ligne directrice pour les essais 414. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Etude de la toxicité pour le développement prénatal. Disponible sur : [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
18. ILAR (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, ISBN 0309053773, National Academies Press, Washington DC.
19. OMS (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, EUA. Disponible sur : [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
20. OMS (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Genève. Disponible sur : [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
21. Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
22. De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
23. Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
24. Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
25. Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
26. Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
27. Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
28. Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

29. Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
30. Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
31. ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Disponible sur : [http://www.ich.org/UrlGrpServer.jsr?@_ID=276&@_TEMPLATE=254].
32. Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.
33. Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
34. Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
35. Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.
36. Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
37. Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
38. Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
39. Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
40. Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.
41. Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
42. Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.

43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
44. Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
45. Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
46. Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
47. Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
48. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
49. Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351
50. Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
51. Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.
52. Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
53. Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
54. Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
55. Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.
56. Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.
57. Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
58. Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.

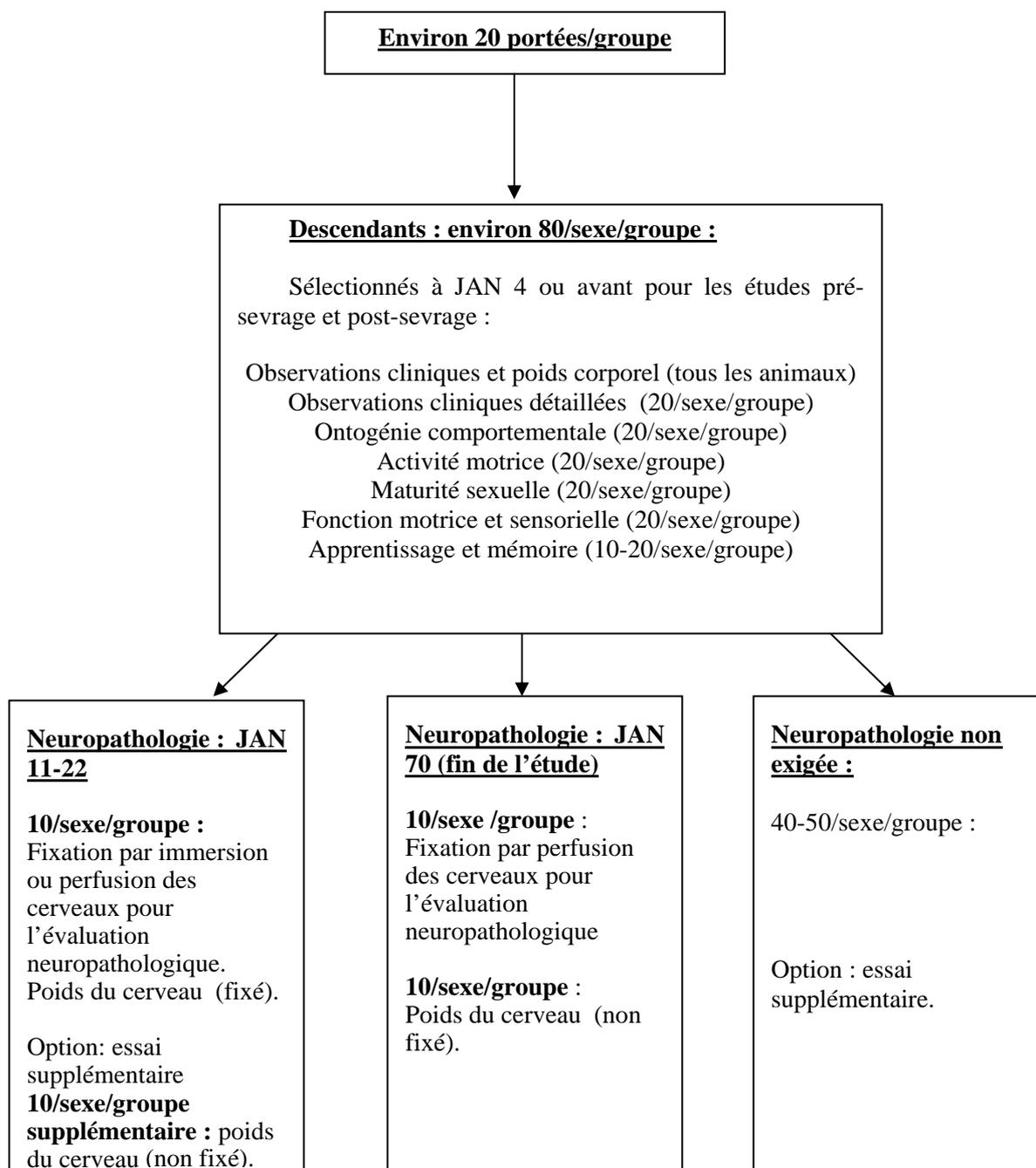
59. Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
60. Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
61. Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
62. Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
63. D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
64. Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
65. Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
66. Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosourea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
67. Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
68. Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
69. Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
70. Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.
71. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.
72. Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
73. Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
74. Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.

75. De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
76. De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.
77. De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
78. Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
79. Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
80. Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
81. Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
82. Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
83. West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
84. Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
85. Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
86. Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
87. Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.
88. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.

89. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
90. Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
91. House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
92. Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
93. US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A. Disponible sur : [<http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=116283>].
94. US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322. Disponible sur : [<http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=2838>].
95. Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
96. Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
97. Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.
98. Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
99. Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
100. Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
101. Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
102. Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
103. Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A ‘best practices’ approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.

104. Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
105. Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
106. Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2007) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).
107. Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2007) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).
108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2007) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).
109. Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2007) Identification and interpretation of treatment-related effects in developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).

Figure 1. Schéma général des essais fonctionnels et comportementaux, de l'évaluation neuropathologique et de la mesure des poids des cerveaux. Ce diagramme s'appuie sur la description présentée dans les paragraphes 13-15 (JAN=jour après la naissance). Des exemples de répartition des animaux sont donnés dans l'Appendice 1.



APPENDICE 1

1. Des exemples de répartitions possibles sont décrits et présentés ci-dessous sous forme de tableaux. Ils sont fournis à titre d'illustration afin de démontrer que l'affectation des animaux de l'étude à divers paradigmes de l'essai peut s'effectuer selon plusieurs modes différents.

Exemple 1

2. Un groupe de 20 petits/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour l'essai avant sevrage de l'ontogénie du comportement. Parmi ces animaux, dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés à JAN 22. Les cerveaux sont prélevés, pesés et soumis à un traitement de préparation pour une évaluation histopathologique. De surcroît, les résultats pondéraux concernant le cerveau sont recueillis sur des cerveaux non fixés appartenant aux 10 mâles et aux 10 femelles restants par dose.

3. On utilise un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) pour les essais fonctionnels et comportementaux post-sevrage (observation clinique détaillée, activité motrice, sursauts auditifs et essais de la fonction cognitive chez les adolescents) et l'évaluation de l'âge de maturité sexuelle. Dix animaux/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) de ce groupe sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation *in situ*, le cerveau est prélevé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.

4. L'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (par exemple JAN 60/70) implique un troisième groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée). Dix animaux/sexe/groupe (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont sacrifiés à la fin de l'étude et leur cerveau est prélevé et pesé.

5. Les 20 autres animaux/sexe/groupe sont réservés à d'autres essais éventuels.

Tableau 1

Petit no. ^a		No. de petits affectés à l'essai	Examen / Essai
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f 10 m + 10 f	Ontogénie du comportement Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 22 Poids du cerveau à JAN 22
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Observations cliniques détaillées Activité motrice Maturité sexuelle Fonction motrice et sensorielle Apprentissage et mémoire (JAN 25) Poids du cerveau de jeunes adultes/neuropathologie/morphométrie ~JAN 70
3	7	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes) Poids du cerveau de jeunes adultes à ~ JAN 70
4	8	--	Animaux en réserve pour les remplacements ou d'autres essais

a) Dans cet exemple, les portées ont été restreintes à 4 mâles + 4 femelles ; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petits femelles de 5 à 8.

Exemple 2

6. Un groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour l'essai avant sevrage de l'ontogénie du comportement. Dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés parmi ces animaux à JAN 11. Les cerveaux sont prélevés, pesés et soumis à un traitement de préparation pour une évaluation histopathologique.

7. On utilise un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) pour les examens fonctionnels et comportementaux post-sevrage (observations cliniques détaillées, activité motrice, évaluation de l'âge de maturité sexuelle, fonction motrice et sensorielle). Parmi ces animaux, dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation *in situ*, le cerveau est prélevé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.

8. L'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (par exemple JAN 60/70) implique 10 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée). Des animaux différents sont utilisés pour les tests de fonction cognitives à JAN 23 et à l'âge jeune adulte. A la fin de l'étude, 10 animaux/sexe/groupe ayant été soumis aux essais sur adultes sont sacrifiés et leur cerveau est prélevé et pesé.

9. Les 20 autres animaux/sexe/groupe non sélectionnés pour les essais sont sacrifiés et éliminés au sevrage.

Tableau 2

Petit no. ^a		No. de petits affectés à l'essai	Examen / Essai
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Ontogénie du comportement Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 11
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Observations cliniques détaillées Activité motrice Maturité sexuelle Fonction motrice et sensorielle Poids du cerveau de jeunes adultes/neuropathologie/morphométrie ~JAN 70
3	7	10 m + 10 f ^b	Apprentissage et mémoire (JAN 23)
3	7	10 m + 10 f ^b	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes) Poids du cerveau de jeunes adultes
4	8	--	Animaux en réserve pour les remplacements ou d'autres essais

- a) Dans cet exemple, les portées ont été restreintes à 4 mâles + 4 femelles ; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petits femelles de 5 à 8.
- b) Des petits différents sont utilisés pour les tests cognitifs à JAN 23 et chez les jeunes adultes (par exemple petits surnuméraires à l'effectif de 20).

Exemple 3

10. Un groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour la pesée du cerveau et l'évaluation neuropathologique à JAN 11. Dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés à PND 11 dans ce groupe et le cerveau est prélevé, pesé et traité à des fins d'évaluation histopathologique. En outre, des données pondérales sur le cerveau sont recueillies sur des cerveaux non-fixés prélevés sur les 10 mâles et les 10 femelles restants par dose.

11. Un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour des examens d'ontogénie du comportement (activité motrice), post-sevrage (activité motrice et évaluation de l'âge de la maturité sexuelle) et une analyse de la fonction cognitive chez les adolescents.

12. Un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est destiné à des essais de fonction motrice et sensorielle (sursaut auditif) et à des observations cliniques détaillées. 10 animaux/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) de ce groupe sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ PND 70). Après une nouvelle fixation *in situ*, le cerveau est prélevé, pesé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.

13. Un autre groupe de 20 petits/sexe/dose est utilisé pour l'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (1 mâle et 1 femelle par portée). Parmi ceux-ci, 10 animaux/sexe/groupe (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont sacrifiés à la fin de l'étude et leur cerveau est prélevé et pesé.

Tableau 3.

Petit no. ^a		No. de petits affectés à l'essai	<i>Examen / Essai</i>
m	f		
1	5	10 m + 10 f 10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 11 Poids du cerveau à JAN 11
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f	Ontogénie du comportement (activité motrice) Activité motrice Maturité sexuelle Apprentissage et mémoire (JAN 27)
3	7	20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Sursaut auditif (adolescents et jeunes adultes) Observations cliniques détaillées Poids du cerveau/neuropathologie.morphométrie du jeune adulte à ~JAN 70
4	8	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes) Poids du cerveau du jeune adulte

a) Pour cet exemple, les portées sont restreintes à 4 mâles + 4 femelles ; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petits femelles de 5 à 8.