

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

Bio-essai utérotrrophique chez les rongeurs : **Essai de dépistage à court terme des propriétés oestrogéniques**

INTRODUCTION

1. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire destinée à réviser les lignes directrices existantes et à établir une nouvelle Ligne directrice concernant le dépistage des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien (1). L'un des éléments de cette activité a été de développer une Ligne directrice relative au bio-essai utérotrrophique chez le rongeur. Le bio-essai utérotrrophique chez le rongeur a donc fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant l'établissement d'un document de référence détaillé (2) (3) et la conduite d'études intra- et interlaboratoires très complètes, destinées à montrer la pertinence et la reproductibilité du bio-essai réalisé avec un puissant oestrogène de référence, des agonistes faibles des récepteurs oestrogéniques, un puissant antagoniste des récepteurs oestrogéniques, et un produit chimique de référence négatif (4)(5)(6)(7)(8)(9). La présente Ligne directrice n° 440 a été établie à la lumière de l'expérience acquise durant le programme de validation de l'essai et des résultats obtenus concernant les agonistes des oestrogènes.

2. Le bio-essai utérotrrophique est un essai de dépistage à court terme qui remonte aux années 30 (27) (28) et qui a été normalisé pour la première fois en 1962 aux fins du dépistage par une commission d'experts (32) (35). Cet essai se fonde sur l'augmentation du poids utérin, encore appelée réponse utérotrrophique (voir 29). Il évalue la capacité d'un produit chimique à provoquer une activité biologique analogue à celle des agonistes ou antagonistes des oestrogènes naturels (17 β -estradiol par exemple), mais il est toutefois beaucoup plus rarement utilisé pour la détection d'antagonistes que d'agonistes. L'utérus réagit aux oestrogènes de deux façons. La réponse initiale est un accroissement pondéral dû à l'absorption d'eau. Cette réaction est suivie par une augmentation du poids due à la croissance tissulaire (30). La réaction de l'utérus chez le rat et la souris est qualitativement comparable.

3. Ce bio-essai sert de test de dépistage *in vivo* et son application doit être envisagée dans le contexte du « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens » (Annexe 2). Dans ce cadre conceptuel, le bio-essai utérotrrophique intervient au Niveau 3 en tant qu'essai *in vivo* fournissant des données sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir le pouvoir oestrogénique.

4. Le bio-essai utérotrrophique est censé faire partie d'une batterie d'essais *in vitro* et *in vivo* destinés à identifier les substances susceptibles d'agir sur le système endocrinien, pour permettre à terme d'évaluer les risques pour la santé humaine ou l'environnement. Le programme de validation de l'OCDE a utilisé des agonistes oestrogéniques puissants et faibles pour évaluer l'aptitude de l'essai à identifier les composés oestrogéniques (4) (5) (6) (7) (8). La sensibilité de la procédure d'essai aux agonistes oestrogéniques a pu ainsi être démontrée, de même que sa bonne reproductibilité intra- et interlaboratoire.

© 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.

5. En ce qui concerne les composés négatifs, seul un produit chimique de référence « négatif » déjà identifié comme tel par l'essai utéro-trophique et les essais *in vitro* de liaison avec les récepteurs a été inclus dans le programme de validation, mais des données complémentaires, extérieures au programme de validation de l'OCDE, ont été évaluées, et ont confirmé la spécificité du bio-essai utéro-trophique pour le dépistage d'agonistes des oestrogènes (16).

CONSIDERATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

6. Les agonistes et antagonistes des oestrogènes agissent comme ligands des récepteurs oestrogéniques α et β et peuvent respectivement activer ou inhiber l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Cela peut avoir des conséquences négatives pour la santé, notamment des effets sur la reproduction et le développement. Il est donc nécessaire d'évaluer rapidement les produits chimiques pour déterminer leur éventuelle activité agoniste ou antagoniste des oestrogènes. Bien qu'instructive, l'affinité d'un ligand et d'un récepteur oestrogénique ou l'activation transcriptionnelle des gènes rapporteurs *in vitro* ne représente qu'un déterminant parmi plusieurs, d'un danger possible. Les autres facteurs déterminants peuvent être l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution entre les tissus cibles, et l'élimination de l'organisme, qui dépendent, au moins en partie, de la voie d'administration et du produit chimique testé. Il est par conséquent nécessaire de dépister l'activité éventuelle d'un produit chimique *in vivo* dans des conditions appropriées, sauf si les caractéristiques ADME (absorption – distribution – métabolisme – élimination) du produit chimique fournissent déjà les informations indispensables. Les tissus utérins réagissent aux oestrogènes par une croissance rapide et vigoureuse, notamment chez les rongeurs de laboratoire, dont le cycle oestral dure environ 4 jours. Les rongeurs, en particulier le rat, sont aussi largement utilisés dans les études de toxicité pour caractériser les dangers. En conséquence, l'utérus des rongeurs est un organe cible approprié pour le dépistage *in vivo* des agonistes et antagonistes des oestrogènes.

7. La présente Ligne directrice s'appuie sur les protocoles employés dans l'étude de validation de l'OCDE qui se sont révélés fiables et reproductibles dans les études intra- et interlaboratoires (5) (7). A l'heure actuelle deux méthodes sont disponibles, l'une utilisant des femelles adultes ovariectomisées (méthode adulte-ovx) et l'autre des animaux immatures, non ovariectomisés (méthode immature). Le programme de validation des essais de l'OCDE a montré que la sensibilité et la reproductibilité de ces deux méthodes étaient comparables. Cependant, la méthode sur des femelles immatures, dont l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique (HPG) est intact, est peut être moins spécifique mais couvre un plus large champ d'investigation que celle pratiquée sur des animaux ovariectomisés, parce qu'elle est sensible à des substances qui interagissent avec l'axe HPG et non pas uniquement avec les récepteurs aux oestrogènes. L'axe HPG de la rate est fonctionnel à partir d'environ 15 jours après la naissance. Avant cet âge, la puberté ne peut pas être accélérée par des traitements comme la GnRH. A l'approche de la puberté, avant l'ouverture du vagin, la femelle a plusieurs cycles silencieux sans ouverture vaginale ni ovulation, mais qui se manifestent par certaines fluctuations hormonales. Si un produit chimique stimule l'axe HPG directement ou indirectement durant cette période, on assiste à une puberté précoce, une ovulation précoce ou une ouverture vaginale accélérée. Les produits chimiques agissant sur l'axe HPG produiront cet effet, mais également certains régimes à niveaux d'énergie métabolisable plus élevés que les autres stimuleront la croissance et accéléreront l'ouverture vaginale sans être oestrogéniques. Ces substances n'induiront pas de réponse utéro-trophique chez les animaux adultes ovariectomisés puisque leur axe HPG ne fonctionne pas.

8. Dans un souci de protection des animaux, on privilégiera la méthode pratiquée sur des rates immatures pour éviter le prétraitement chirurgical des animaux et le risque de ne pas pouvoir utiliser les animaux manifestant des signes de proœstrus (voir le paragraphe 30).

9. La réponse utérotrrophique n'est pas entièrement d'origine oestrogénique, d'autres substances que les agonistes ou antagonistes des oestrogènes peuvent aussi intervenir. Par exemple, des doses relativement élevées de progestérone, de testostérone ou de diverses progestines synthétiques peuvent aussi induire une stimulation (30). Toutes les réactions peuvent faire l'objet d'une analyse histologique indiquant une kératinisation et une cornification du vagin (30). Indépendamment de l'origine possible de la réponse, tout bio-essai utérotrrophique positif doit normalement donner à des recherches plus poussées, permettant d'apporter des clarifications. Le pouvoir oestrogénique peut être confirmé par des essais *in vitro*, notamment par des essais de liaison avec les récepteurs ER et des essais d'activation transcriptionnelle, ou par d'autres essais *in vivo* notamment l'essais de puberté chez les femelles.

10. Sachant que le bio-essai utérotrrophique sert d'essai de dépistage *in vivo*, la méthode de validation adoptée a pris en compte le bien-être des animaux et retenu une stratégie d'essai par étapes. A cette fin, des efforts ont été déployés pour valider de façon rigoureuse la reproductibilité et la sensibilité du dépistage du pouvoir oestrogénique (problème majeur pour beaucoup de produit chimiques), mais peu de travaux ont été consacrés à la composante antioestrogénique de l'essai. Un seul antioestrogène, puissant, a été testé, étant donné que le nombre de substances possédant un profil clairement antioestrogénique (qui ne soit pas masqué par une activité oestrogénique) est très limité. En conséquence, la présente Ligne directrice est dédiée au protocole oestrogénique, tandis que le protocole décrivant le mode antagoniste de l'essai figure dans un Document d'orientation. La reproductibilité et la sensibilité de l'essai pour les substances ayant une activité purement anti-oestrogénique seront mieux définies ultérieurement, lorsque la procédure d'essai aura été utilisée de façon routinière pendant assez longtemps et que davantage de substances présentant ce mode d'action auront été identifiées.

11. Il est reconnu que toutes les procédures faisant appel à des animaux respecteront les normes locales en matière de bien-être animal ; les descriptifs des soins et traitements figurant ci-après constituent donc des normes minimales auxquelles se substitueront les réglementations locales. D'autres orientations relatives au traitement humain des animaux ont été formulées par l'OCDE (25).

12. Comme dans tous les essais faisant appel à des animaux vivants, il est indispensable de s'assurer que les données sont réellement nécessaires avant de commencer l'essai. A titre d'exemple, des données peuvent être réellement nécessaires dans les deux situations suivantes :

- risque d'exposition élevé (Niveau 1 du Cadre conceptuel, annexe 2) ou éléments indiquant un pouvoir oestrogénique (Niveau 2) d'où nécessité d'étudier si ces effets peuvent se produire *in vivo*
- effets témoignant d'un pouvoir oestrogénique aux Niveaux 4 et 5 dans les essais *in vivo* d'où nécessité de démontrer que les effets sont liés à un mécanisme oestrogénique qui ne peut être mis en évidence dans les essais *in vitro*.

13. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice sont présentées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La sensibilité du bio-essai utérotrrophique exige un dispositif d'essai dans lequel l'axe hypothalamo-pituitaire-ovarien n'est pas fonctionnel, d'où de faibles niveaux d'oestrogènes endogènes en circulation. Cela assurera des poids utérins de référence peu élevés et un éventail le plus large possible de réponses aux oestrogènes administrés. Les rongeurs femelles remplissent ces conditions dans deux cas :

- i) femelles immatures, après sevrage et avant la puberté
- ii) jeunes femelles adultes ovariectomisées, passé le délai nécessaire à la régression des tissus utérins.

15. La substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée. Des doses modulées de la substance d'essai sont administrées à au moins deux groupes d'animaux (pour plus de précisions voir le paragraphe 33) ; on applique un niveau de dose par groupe ; la période d'administration est de trois jours consécutifs dans la méthode sur femelles immatures et d'au minimum trois jours consécutifs dans la méthode sur femelles adultes ovariectomisées. Les animaux sont sacrifiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Pour dépister les agonistes des oestrogènes, on mesure le rapport entre le poids utérin moyen des animaux des groupes d'essai et celui des animaux du groupe témoin qui a reçu le véhicule pour déterminer s'il existe une augmentation statistiquement significative. Une augmentation statistiquement significative du poids utérin moyen d'un groupe d'essai indique une réponse positive à ce bio-essai.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Sélection de l'espèce animale

16. Les souches de rongeurs utilisées communément en laboratoire peuvent convenir. Par exemple, les souches de rats Sprague-Dawley et Wistar ont été utilisées pour la validation. Il conviendra de ne pas utiliser les souches pour lesquelles on sait où on suspecte que l'utérus est moins réactif. Le laboratoire doit démontrer la sensibilité de la souche utilisée comme indiqué aux paragraphes 26 et 27.

17. Depuis les années 30, le rat et la souris sont utilisés de façon routinière pour le bio-essai utéro-trophique. Les études de validation de l'OCDE ont été effectuées seulement sur des rats, étant entendu que ces deux espèces sont en principe équivalentes et qu'une seule devrait suffire pour la validation mondiale, l'idée étant d'économiser les ressources et de préserver les animaux. L'espèce retenue pour la plupart des études de toxicité pour la reproduction et le développement est le rat. Sachant que l'on dispose d'une riche base de données rétrospectives concernant la souris et, pour élargir le champ d'application de la Ligne directrice relative au bio-essai utéro-trophique chez les rongeurs, une étude de validation complémentaire limitée a été effectuée sur la souris (16). On a adopté une approche comparative faisant intervenir un nombre limité de produit chimiques testés et de laboratoires, sans tests d'échantillons codés de façon à respecter l'intention première d'économiser les ressources et de préserver les animaux. L'étude comparative de validation du bio-essai utéro-trophique chez la jeune femelle de souris adulte ovariectomisée indique une bonne correspondance qualitative et quantitative des données obtenues chez le rat et chez la souris. Lorsque les résultats du bio-essai utéro-trophique sont obtenus préalablement à une étude à long terme, cela permet d'utiliser les animaux de la même souche et de la même source dans les deux études. L'approche comparative n'a été utilisée que sur la souris ovariectomisée et l'ensemble de données fournies dans le rapport n'est pas assez solide pour valider le modèle sur la souris femelle immature, c'est pourquoi ce modèle n'entre pas dans le champ d'application de la présente Ligne directrice.

18. Ainsi, dans certains cas, la souris pourra être utilisée à la place du rat. Ce choix devra être justifié par des données toxicologiques, pharmacocinétiques et/ou par d'autres critères. Il pourra nécessiter certaines modifications du protocole. Par exemple, la consommation alimentaire d'une souris rapportée à son poids corporel est plus élevée que celle d'une rate, c'est pourquoi la quantité de phytoestrogènes contenue dans les aliments devra être plus faible pour la souris que pour le rat (9)(20)(22).

Conditions d'élevage et d'alimentation

19. Toutes les procédures doivent être conformes aux normes locales relatives à l'entretien des animaux de laboratoire. Les conditions d'entretien et de traitement décrites ici sont des normes minimales et seront remplacées par la réglementation applicable, lorsqu'elle existe. La température du local expérimental doit être de 22°C (\pm 3°C). Le taux d'humidité relative devrait être d'au moins 30% et, de

préférence, ne pas dépasser 70% en dehors des heures de nettoyage du local. On s'efforcera de maintenir le taux d'humidité entre 50 et 60%. Un éclairage artificiel est utilisé. La séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

20. Les animaux recevront de la nourriture et de l'eau potable à volonté. Les jeunes animaux adultes peuvent être placés dans des cages individuelles ou collectives pouvant contenir jusqu'à trois individus. Compte tenu de leur jeune âge, les animaux immatures seront de préférence placés dans des cages collectives.

21. On sait que les aliments pour animaux de laboratoire contenant des niveaux élevés de phytoestrogènes font augmenter le poids utérin chez les rongeurs dans des proportions suffisantes pour interférer avec le bio-essai utéro-trophique (13) (14) (15). Des taux élevés de phytoestrogènes et d'énergie métabolisable dans la nourriture de laboratoire peuvent aussi induire une puberté précoce si l'on utilise des animaux immatures. La présence de phytoestrogènes résulte principalement de l'inclusion de soja et d'alfalfa dans les mélanges de laboratoire et il a été constaté que les concentrations de phytoestrogènes variaient selon les lots de mélange standard (23). Le poids corporel est une variable importante, étant donné que la quantité de nourriture consommée lui est corrélée. Par conséquent, la dose de phytoestrogène effectivement consommée avec le même régime peut varier selon les espèces et les âges (9). En ce qui concerne les rats femelles immatures, la consommation alimentaire rapportée au poids corporel peut représenter près du double de celle des jeunes femelles adultes ovariectomisées. Pour les jeunes souris adultes, la consommation alimentaire rapportée au poids corporel peut représenter environ quatre fois celle des jeunes rates adultes ovariectomisées.

22. Les résultats du bio-essai utéro-trophique (9) (17) (18) (19) indiquent toutefois que de faibles quantités de phytoestrogènes sont acceptables dans la nourriture et ne réduisent pas la sensibilité du bio-essai. A titre indicatif, les quantités de phytoestrogènes dans les aliments ne doivent pas dépasser 350 µg d'équivalents génistéine/gramme de mélange de laboratoire pour les rates immatures Sprague Dawley et Wistar (6) (9). Ce régime devrait aussi convenir pour les essais sur les jeunes rates adultes ovariectomisées car la consommation de nourriture rapportée au poids corporel est moins importante chez les jeunes adultes que chez les animaux immatures. Si l'on doit utiliser des souris adultes ovariectomisées ou des rates plus sensibles aux phytoestrogènes, il faudra envisager de réduire les niveaux de phytoestrogènes en conséquence (20). De plus, les quantités différentes d'énergie métabolisable dans les différents régimes peuvent décaler le début de la puberté (21) (22).

23. Avant de commencer l'étude, le régime alimentaire sera soigneusement établi en veillant à éviter les taux élevés de phytoestrogènes (voir (6) (9)) ou d'énergie métabolisable, qui peuvent fausser les résultats (15) (17) (19) (22) (36). Il importe de contrôler ces deux facteurs pour assurer la bonne marche du dispositif d'essai utilisé par le laboratoire conformément aux paragraphes 26 et 27. Par mesure de sécurité et en application des BPL, un échantillon représentatif de chaque lot de nourriture administré durant l'étude sera prélevé pour permettre une analyse de la présence de phytoestrogènes (par exemple en cas de poids utérin élevé chez les animaux témoins par rapport aux données précédentes, ou de réponse inadéquate à l'oestrogène de référence, 17-alpha-éthinyloestradiol). Les aliquotes doivent être analysées dans le cadre de l'étude ou congelées à -20°C ou conservées selon une méthode permettant d'éviter que l'échantillon ne se décompose avant analyse.

24. Certains types de litières peuvent contenir des substances oestrogéniques ou antioestrogéniques à l'état naturel (par exemple, on sait que la rafle de maïs influe sur le cycle des rates et pourrait avoir des effets antioestrogéniques). Le type de litière choisi devra contenir le moins possible de phytoestrogènes.

Préparation des animaux

25. Les animaux d'expérience, choisis après avoir vérifié qu'ils ne présentent pas de signes de maladie ni d'anomalie physique, sont répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être disposées de façon à réduire le plus possible les effets éventuels de leur emplacement. Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle. Pendant la période d'acclimatation, les animaux immatures doivent être gardés dans des cages avec leurs mères ou d'autres femelles allaitantes jusqu'à ce qu'ils soient sevrés. La période d'acclimatation précédant le début de l'expérience doit durer environ 5 jours pour les jeunes femelles adultes et pour les animaux immatures livrés avec leur mère ou d'autres femelles. Si les animaux immatures sont livrés sans leur mère et déjà sevrés, la période d'acclimatation devra être plus courte puisque l'administration doit commencer immédiatement après le sevrage (voir le paragraphe 29).

PROCEDURE

Vérification des compétences du laboratoire

26. Deux options sont possibles pour vérifier les compétences d'un laboratoire :

- Opérer une vérification périodique, en se référant à une étude initiale de contrôle positif (voir le paragraphe 27). Au moins tous les 6 mois et chaque fois qu'un changement risque d'influer sur les résultats de l'essai (nouvelle formulation du mélange alimentaire, modification du personnel chargé des dissections, changement de souche animale ou de fournisseur, etc.), la sensibilité du dispositif (modèle animal) doit être vérifiée en utilisant une dose adéquate (conformément à l'étude de contrôle positive décrite au paragraphe 27) de l'oestrogène de référence : 17 α -éthynylestradiol (CAS No. 57-63-6) (EE).
- Opérer des contrôles concomitants, en incluant un groupe recevant une dose appropriée de l'oestrogène de référence dans chaque essai.

Si le dispositif ne produit pas la réponse attendue, les conditions expérimentales devront être revues et modifiées en conséquence. Pour les deux approches, la dose de l'oestrogène de référence recommandée doit correspondre approximativement à la dose efficace 70 à 80.

27. **Étude de référence - témoin positif** : Avant d'effectuer pour la première fois une étude suivant cette Ligne directrice, chaque laboratoire doit démontrer ses compétences en testant la sensibilité du modèle animal et en établissant la relation dose-effet pour un oestrogène de référence, le 17 α -éthynylestradiol (CAS No. 57-63-6) (EE) avec au minimum quatre doses. L'effet sur le poids utérin sera comparé aux données historiques attestées (voir référence (5)). Si l'étude de référence ne donne pas les résultats escomptés les conditions de l'expérience devront être revues et modifiées.

Nombre et condition des animaux

28. Chaque groupe d'essai et de référence doit comprendre au moins 6 animaux (pour les protocoles des méthodes sur femelles immatures et ovariectomisées).

Age des animaux immatures

29. Pour le bio-essai utéro-trophique pratiqué sur des animaux immatures, le jour de la naissance doit être spécifié. L'administration doit commencer assez tôt pour faire en sorte qu'à la fin de la période d'administration, l'augmentation physiologique des oestrogènes endogènes associée à la puberté n'ait pas commencé. D'un autre côté, il a été constaté que les très jeunes animaux peuvent être moins réactifs. Pour

définir l'âge optimal des animaux d'essai, chaque laboratoire doit se reporter à son corpus de données de référence sur la maturation.

En règle générale, le traitement des rats peut commencer immédiatement après un sevrage précoce, au jour 18 après la naissance (le jour de la naissance étant le jour 0). Il doit s'arrêter de préférence au jour 21 après la naissance mais dans tous les cas avant le jour 25 après la naissance, car au delà, l'axe hypothalamo-pituito-ovarien devient fonctionnel et les taux d'oestrogènes endogènes peuvent commencer à augmenter avec accroissement concomitant des poids utérins moyens et augmentation des écarts types (2) (3) (10) (11) (12).

Procédure d'ovariectomie

30. Dans l'essai sur les rats et les souris femelles ovariectomisées (groupes d'essai et groupes témoins), l'ovariectomie doit être pratiquée entre 6 et 8 semaines d'âge. Chez le rat, 14 jours au minimum doivent s'écouler entre l'ovariectomie et la première administration afin de permettre la régression de l'utérus à un poids minimum de référence stable. Chez la souris, 7 jours au minimum doivent s'écouler entre l'ovariectomie et le premier jour de traitement. Une petite quantité de tissu ovarien suffit à produire des taux élevés d'oestrogènes en circulation (3), c'est pourquoi les animaux doivent être contrôlés avant l'essai, en observant les cellules épithéliales prélevées dans le vagin pendant au moins cinq jours consécutifs (par exemple du 10^{ème} au 14^{ème} jour après ovariectomie pour les rates). Si les animaux présentent des signes de proœstrus, ils ne doivent pas être utilisés. Ultérieurement, lors de la nécropsie, les moignons ovariens doivent être examinés pour repérer s'il reste du tissu ovarien. Si c'est le cas, les données de l'animal ne doivent pas être prises en compte dans les calculs (3).

31. L'ovariectomie est opérée sur l'animal couché sur le ventre, qui aura été convenablement anesthésié. La paroi abdominale dorso-latérale est incisée sur environ un centimètre au point médian entre la limite costale inférieure et la crête iliaque, à quelques millimètres de la marge latérale du muscle lombaire. Les ovaires sont extraits de la cavité abdominale, déposés sur un champ aseptique puis détachés au niveau de la jonction de l'oviducte et du corps utérin. Après avoir vérifié qu'aucun saignement important ne se produit, on recoud la paroi abdominale puis la peau est refermée par des autoclips ou par suture. Les points de ligature sont indiqués schématiquement **Figure 1**. Une analgésie post-opératoire appropriée recommandée par un vétérinaire spécialiste des rongeurs doit être pratiquée.

Poids corporel

32. Dans la méthode sur animaux adultes ovariectomisés, le poids corporel et le poids utérin ne sont pas corrélés parce que le poids utérin est affecté par des hormones telles que les oestrogènes mais pas par les facteurs de croissance qui régulent la taille du corps. Dans le modèle sur animaux immatures au contraire, le poids corporel est corrélé au poids utérin, pendant la période de maturation (34). Par conséquent, au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés, dans le modèle sur animaux immatures, doit être minimale et ne pas excéder $\pm 20\%$ du poids moyen. Cela signifie que la taille des portées doit être standardisée par l'éleveur pour assurer que les petits de mères différentes soient nourris sensiblement de la même façon. Les animaux sont répartis de façon aléatoire par groupes (témoin et d'essai), de façon à ce qu'il n'y ait aucune différence statistique entre le poids corporel moyen des différents groupes. Il conviendra d'éviter dans la mesure du possible de mettre plusieurs animaux d'une même portée dans le même groupe de traitement, sans que cela fasse augmenter le nombre de portées nécessaires à l'étude.

Dosage

33. Deux groupes de dose et un groupe témoin suffisent habituellement pour établir si une substance d'essai peut avoir une action oestrogénique *in vivo* et on préférera donc cette méthode pour des raisons de

protection des animaux. Si l'objectif est d'obtenir une courbe de la relation dose-effet ou d'extrapoler les résultats à des doses plus faibles, au moins 3 groupes de dose seront nécessaires. Si l'on souhaite obtenir des informations plus poussées sur l'activité oestrogénique (estimation du pouvoir oestrogénique, par exemple), un autre système de dosage devra être envisagé. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin devront avoir exactement le même traitement que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance d'essai, le groupe témoin doit recevoir la même quantité du véhicule utilisé que les groupes traités (ou le volume le plus important administré si les groupes ne reçoivent pas les mêmes doses).

34. L'objectif, dans le cas du bio-essai utéro-trophique, est de choisir des doses qui assurent la survie des animaux et n'entraînent pas de détresse ni d'effets toxiques graves après trois jours consécutifs d'administration du produit chimique, jusqu'à une dose maximum de 1000 mg/kg/j. Tous les niveaux de dose doivent être proposés et sélectionnés à la lumière des données existantes sur la toxicité et le comportement (toxico)-cinétique du composé testé ou des substances de même nature. Le niveau de dose le plus élevé doit être établi tout d'abord en fonction de la DL50 et/ou des informations sur la toxicité aiguë afin d'éviter le décès, la détresse ou la souffrance extrêmes des animaux (24) (25) (26). La dose la plus élevée doit représenter la dose maximale tolérée (MTD) ; une étude menée avec un niveau de dose ayant induit une réaction utéro-trophique positive pourra aussi être acceptée. Pour opérer la sélection, on accepte généralement de larges intervalles entre les dosages (une demi unité logarithmique, soit un facteur de progression de 3,2 ou même jusqu'à une unité logarithmique). En l'absence de données appropriées, une étude de détermination de l'ordre de grandeur peut être effectuée pour aider à définir les doses qu'il convient d'utiliser.

35. Autre solution, si l'activité œstrogénique d'un agoniste peut être estimée d'après des données *in vitro* (ou *in silico*), celles-ci pourront être prises en considération pour établir les doses. Par exemple, la quantité de substance chimique d'essai qui produira une réaction utéro-trophique équivalente à celle de l'agoniste de référence (éthinyloestradiol) est estimée d'après son activité évaluée *in vitro* par rapport à celle de l'éthinyloestradiol. La dose d'essai la plus élevée sera obtenue en multipliant cette dose équivalente par un facteur adéquat (10 ou 100, par exemple).

Détermination de l'ordre de grandeur

36. Le cas échéant, une étude de détermination de l'ordre de grandeur peut être effectuée sur un petit nombre d'animaux. A cet égard, le document d'orientation de l'OCDE n°19 (25) qui définit les signes cliniques indicateurs de toxicité ou de détresse des animaux peut être utilisé. Si cela est réalisable dans le cadre de cette étude de détermination, après trois jours de traitement, les utérus peuvent être excisés et pesés environ 24 heures après la dernière dose. Ces données peuvent ensuite être utilisées pour mettre au point l'étude principale (définir les doses maximum et minimum acceptables et recommander le nombre de groupes de dose).

Administration des doses

37. La substance d'essai est administrée par gavage ou injection sous-cutanée. La voie d'administration sera déterminée en tenant compte de considérations relatives au bien-être des animaux, et aux aspects toxicologiques tels que le rapport avec l'exposition humaine au produit chimique (gavage oral pour une exposition par ingestion, injection sous-cutanée pour une exposition par inhalation ou adsorption cutanée), les propriétés physiques/chimiques de la substance d'essai et surtout les informations toxicologiques existantes et les données sur le métabolisme et le comportement cinétique (par exemple la nécessité d'éviter le métabolisme de premier passage, meilleure efficacité d'une voie d'administration plutôt que d'une autre).

38. Il est recommandé, chaque fois que cela est possible, d'envisager pour commencer l'utilisation d'une solution/suspension aqueuse. Toutefois, les ligands des récepteurs aux oestrogènes ou leurs précurseurs métaboliques sont généralement hydrophobes, c'est pourquoi on utilise le plus souvent une solution/suspension huileuse (huile de maïs, d'arachide, de sésame ou d'olive). Ces différentes huiles n'ont toutefois pas la même valeur calorique, ni la même teneur en matières grasses, c'est pourquoi le véhicule peut influencer sur l'apport total d'énergie métabolisable et peut donc potentiellement modifier les paramètres mesurés notamment le poids utérin, surtout dans la méthode sur animaux immatures (33). Ainsi, avant de commencer l'étude, le véhicule retenu doit être testé au regard de témoins sans véhicule. Les substances d'essai peuvent être dissoutes dans une quantité minimale d'éthanol 95% ou d'autres solvants appropriés, puis diluées dans le véhicule de l'essai aux concentrations finales voulues. Les caractéristiques toxiques du solvant doivent être connues et contrôlées sur un groupe témoin traité uniquement avec le solvant. Si la substance d'essai est considérée comme stable, on peut légèrement chauffer le mélange et le soumettre à une action mécanique vigoureuse pour faciliter sa dissolution. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée. Si la substance d'essai est stable pendant toute la durée de l'étude, une aliquote de la substance d'essai peut être préparée, après quoi les dilutions spécifiées sont préparées quotidiennement.

39. Le calendrier d'administration dépend du modèle d'essai (voir le paragraphe 29 pour l'essai sur animaux immatures et le paragraphe 30 pour l'essai sur animaux ovariectomisés). La substance d'essai est administrée quotidiennement aux rates immatures pendant trois jours consécutifs. Un traitement de trois jours est également recommandé pour les rates ovariectomisées mais des expositions plus longues peuvent être aussi acceptées et favoriser la détection de substances faiblement actives. Sur les souris femelles ovariectomisées, 3 jours de traitement doivent suffire et il ne semble pas très intéressant de porter la durée du traitement à sept jours pour les agonistes d'oestrogènes puissants ; toutefois l'étude de validation n'a pas permis d'établir cette relation pour les oestrogènes de plus faible activité (16) aussi la durée d'administration doit être prolongée jusqu'à 7 jours consécutifs chez les souris ovariectomisées. Le produit doit être administré chaque jour à heure fixe. L'administration doit se faire de façon à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux (mg de substance d'essai par kg de poids corporel par jour). On réduira au minimum la variabilité du volume d'essai par rapport au poids corporel en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses et pour toutes les voies d'administration.

40. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux reçoivent une seule dose quotidienne à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximum de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Les directives locales d'entretien des animaux doivent être observées, mais le volume ne doit pas excéder 5 ml/kg de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel.

41. Lorsque la substance d'essai est administrée par injection sous-cutanée, les animaux reçoivent une seule dose quotidienne. Les doses doivent être injectées dans la région dorso-scapulaire ou lombaire à l'aide d'une aiguille stérile (de calibre 23 ou 25) et d'une seringue tuberculine. Le rasage du site d'injection est facultatif. Toute perte ou fuite au moment de l'injection ou toute administration incomplète doivent être consignées. Le volume total injecté par rate par jour ne doit pas dépasser 5 ml/kg de poids corporel, répartis entre 2 sites d'injection, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel.

Observations

Observations générales et cliniques

42. Des observations cliniques générales doivent être effectuées au moins une fois par jour et plus fréquemment si des signes de toxicité sont constatés. Ces observations doivent être effectuées de préférence chaque jour à la ou aux même(s) heure(s) et en tenant compte du moment où les effets devraient être le plus marqués après l'administration des doses. Tous les animaux sont soumis à des observations pour contrôler la mortalité, la morbidité et les signes cliniques généraux tels que les changements de comportement, les changements au niveau de la peau, du pelage, des yeux et des muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et les activités végétatives (larmoiement, piloérection, taille des pupilles, respiration inhabituelle, par exemple).

Poids corporel et consommation alimentaire

43. Tous les animaux doivent être pesés quotidiennement à 0.1 gramme près, en commençant juste avant le début du traitement c'est-à-dire au moment de la répartition des animaux par groupes. La quantité de nourriture consommée durant la période de traitement peut aussi être mesurée cage par cage en pesant les distributeurs d'aliments. Ces données d'alimentation facultatives doivent être exprimées en grammes par rat par jour.

Dissection et pesage de l'utérus

44. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, les rats sont euthanasiés. Idéalement, le sacrifice est effectué de façon aléatoire entre les groupes pour éviter de faire passer en premier ou en dernier l'un ou l'autre groupe, ce qui pourrait légèrement affecter les données. L'objectif du bio-essai est de mesurer le poids des utérus séchés et frais. Le poids frais est celui de l'utérus et du fluide luminal. Le poids « séché » est mesuré après avoir exprimé et éliminé le contenu luminal de l'utérus.

45. Avant la dissection, le vagin sera contrôlé pour repérer une éventuelle ouverture chez les animaux immatures. La procédure de dissection commence par l'ouverture de la paroi abdominale au niveau de la symphyse pubienne. S'ils sont présents, les cornes utérines et les ovaires sont détachés de la paroi abdominale dorsale. La vessie et les uretères sont dégagés de la face ventrale et latérale de l'utérus et du vagin. Les adhérences fibreuses entre le rectum et le vagin sont libérées jusqu'à ce que l'on repère la jonction de l'orifice vaginal et du périnée. L'utérus et le vagin sont détachés du corps par incision de la paroi vaginale juste au-dessus de la jonction du périnée comme indiqué sur la [Figure 2](#). L'utérus doit être détaché du corps en découpant soigneusement le mésentère à son point d'attache sur toute la longueur de la façade dorso-latérale de chaque corne. Après extraction de l'utérus, la manipulation doit être assez rapide pour éviter la dessiccation des tissus. La perte de poids due à la dessiccation devient plus importante avec des tissus minces tels que l'utérus (23). S'ils sont présents, les ovaires sont détachés au niveau de l'oviducte en évitant l'écoulement de fluide luminal de la corne utérine. Si l'animal a été ovariectomisé, les cicatrices seront examinées pour repérer l'éventuelle présence de tissu ovarien. La graisse excédentaire et le tissu conjonctif doivent être éliminés. Le vagin est détaché de l'utérus juste à la base du col de l'utérus pour que celui-ci reste solidaire du corps utérin comme indiqué à la [Figure 2](#).

46. Chaque utérus doit être transféré dans un récipient pesé portant un marquage individuel (boîte de Petri ou nacelle de pesée en plastique) en continuant de veiller à ce qu'il ne se dessèche pas avant la pesée (un filtre papier légèrement imbibé de solution saline peut être placé au fond du récipient). L'utérus et le fluide luminal seront pesés à 0.1 mg près (poids frais).

47. Chaque utérus sera ensuite traité individuellement pour extraire le fluide luminal. Les deux cornes utérines seront percées ou sectionnées selon un axe longitudinal. L'utérus sera placé sur un filtre

papier légèrement humidifié (Whatman No. 3, par exemple) puis comprimé doucement avec un second morceau de filtre papier légèrement humidifié jusqu'à élimination complète du fluide luminal. L'utérus vidé de son contenu luminal sera ensuite pesé à 0.1 mg près (poids séché).

48. Le poids utérin en fin d'essai peut être utilisé pour vérifier que les rates immatures intactes n'ont pas dépassé l'âge applicable, bien que les données historiques de la souche utilisée par le laboratoire soient déterminantes à cet égard (voir le paragraphe 56 pour l'interprétation des résultats).

Études optionnelles

49. Après avoir été pesé, l'utérus peut être placé dans du formol à 10% tamponné à pH neutre pour examen histopathologique après coloration hématoxyline-éosine. Le vagin peut être aussi examiné (voir le paragraphe 9). Des mesures morphométriques peuvent être par ailleurs effectuées sur l'épithélium endométrial pour opérer des comparaisons quantitatives.

DONNES ET RAPPORT D'ESSAIS

Données

50. Les informations suivantes doivent être fournies :

- le nombre d'animaux au début de l'essai,
- le nombre et l'identité des animaux retrouvés morts pendant l'essai ou euthanasiés en raison de leurs souffrances, ainsi que la date et l'heure des décès des animaux morts naturellement ou euthanasiés,
- le nombre et l'identité des animaux présentant des signes de toxicité, et une description des signes de toxicité observés indiquant notamment la date et l'heure de l'apparition, la durée et la sévérité des effets toxiques, et
- le nombre et l'identité des animaux présentant des lésions et une description du type de lésions.

51. Les données suivantes doivent être consignées pour chaque animal : poids corporels, poids utérin frais et poids de l'utérus séché. Des analyses statistiques unilatérales pour les agonistes doivent être utilisées pour déterminer si l'administration d'une substance d'essai provoque une augmentation statistiquement significative ($p < 0.05$) du poids utérin. Les analyses statistiques requises doivent être effectuées pour étudier les modifications liées au traitement, des poids des utérus frais et séchés. Par exemple, les données peuvent être évaluées par une analyse de covariance (ANCOVA), la co-variable étant le poids corporel à la nécropsie. Une transformation logarithmique stabilisant la variance peut être opérée sur les données utérines avant l'analyse des données. Le test de Dunnett et Hsu peut être utilisé pour opérer des comparaisons par paires entre les groupes traités et les groupes témoins et pour calculer les intervalles de confiance. Une analyse des résidus studentisés peut permettre de détecter les éventuelles valeurs aberrantes et d'évaluer l'homogénéité des variances. Ces procédures ont été appliquées dans le programme de validation de l'OCDE à l'aide de la PROC GLM du Système d'analyse statistique (SAS Institute, Cary, NC), version 8 (6) (7).

52. Le rapport final doit contenir les informations suivantes :

Dispositif expérimental :

- Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun

- Données de l'étude de référence - témoin positif, et données périodiques de contrôle positif (voir les paragraphes 26 et 27)

Substance d'essai :

- Caractérisation des substances d'essai
- Nature physique et, le cas échéant, propriétés physico-chimiques utiles pour la conduite de l'essai
- Méthode et fréquence de préparation des dilutions
- Données obtenues sur la stabilité
- Analyses des solutions administrées

Véhicule:

- Caractérisation du véhicule de l'essai (nature, fournisseur et lot)
- Justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau)

Animaux d'expérience :

- Espèce et souches utilisées et justification du choix de ces espèces/souches
- Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur
- Age à la livraison et date de naissance
- Si les animaux sont immatures, s'ils sont fournis avec leurs mères ou d'autres femelles allaitantes et date du sevrage
- Détails des procédures d'acclimatation des animaux
- Nombre d'animaux par cage
- Données détaillées et méthode d'identification des individus et des groupes d'animaux

Conditions de l'essai :

- Détails de la procédure de randomisation (par exemple, méthode utilisée)
- Justification de la sélection des doses
- Détails de la formulation de la substance d'essai, concentrations obtenues, stabilité et homogénéité
- Détails relatifs à l'administration de la substance d'essai et justification de la voie d'exposition
- Alimentation (nom, type, fournisseur, composition, et, s'il sont connus, les taux de phytoœstrogènes)
- Eau distribuée (eau du robinet ou eau filtrée, par exemple) et mode d'administration (par tube alimenté par un grand réservoir, flacons, etc.)
- Litière (nom, type, fournisseur, composition)
- Données sur les conditions d'encagement, photopériode, température et humidité du local expérimental, nettoyage du local expérimental
- Description détaillée des procédures de nécropsie et de pesée des utérus
- Description des procédures statistiques

Résultats**Pour chaque animal :**

- Relevés journaliers du poids corporels (de la répartition en groupes jusqu'à la nécropsie) (à 0.1 g près)
- Age de chaque animal (en jours à compter du jour 0, jour de la naissance) au début du traitement

- Date et heure de l'administration de chaque dose
- Volume calculé et dose administrée et observations de toute perte de produit pendant ou après l'administration
- Observations journalières sur l'état de l'animal, notamment symptômes pertinents
- Cause présumée du décès (si l'animal est trouvé mort ou moribond pendant l'étude)
- Date et heure de l'euthanasie et temps écoulé depuis l'administration de la dernière dose
- Poids utérin frais (à 0.1 mg près) et observations concernant les éventuels écoulements de fluide luminal pendant la dissection et la préparation avant pesée
- Poids utérin séché (à 0.1 mg près)

Pour chaque groupe d'animaux:

- Relevés journaliers du poids corporels moyen (à 0.1 g près) et écarts-types (de la répartition en groupes jusqu'à la nécropsie)
- Poids utérins moyens frais et séché (à 0.1 mg près) et écarts-types
- Si elle a été mesurée, consommation alimentaire journalière (calculée en grammes de nourriture consommée par animal)
- Les résultats des analyses statistiques comparant les poids utérins frais et séchés des groupes traités par rapport à ceux des groupes témoins qui ont reçu le véhicule.
- Les résultats des analyses statistiques comparant le poids corporel total et la prise de poids corporel des groupes traités par rapport à ceux des groupes témoins qui ont reçu le véhicule.

53. Résumé des principaux éléments et conditions de la Ligne directrice pour les essais

	Rat	Souris
Animaux		
Souche	Souches de rongeurs de laboratoire communément utilisées	
Nombre of animaux	6 animaux par groupe de dose au minimum	
Nombre de groupes	Au minimum 2 groupes d'essai (voir le paragraphe 33) et un groupe témoin négatif Pour les groupes témoins positifs, se référer aux paragraphes 26 et 27	
Conditions d'encagement et d'alimentation		
T° du local expérimental	22°C ± 3°C	
Humidité relative	50-60%, pas moins de 30% pas plus de 70%	
Photopériode journalière	12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité	
Alimentation et eau potable	A volonté	
Encagement	Individuel ou par groupes de jusqu'à trois animaux (l'hébergement collectif est recommandé pour les animaux immatures)	
Alimentation et litière	Faibles niveaux de phytoestrogènes recommandés dans la nourriture et la litière	
Protocole		
Méthode	Méthode utilisant des femelles immatures non ovariectomisées (méthode à privilégier). Méthode utilisant des femelles adultes ovariectomisées	Méthode utilisant des femelles adultes ovariectomisées
Age de traitement des animaux immatures	Pas avant le jour 18 après la naissance. Le traitement doit être achevé avant le jour 25 après la naissance	Non applicable pour cette LD
Age à l'ovariectomie	Entre 6 et 8 semaines d'âge.	
Age de traitement des animaux ovariectomisés	Il doit s'écouler au minimum 14 jours entre l'ovariectomie et le 1 ^{er} jour du traitement.	Il doit s'écouler au minimum 7 jours entre l'ovariectomie et le 1 ^{er} jour du traitement.
Poids corporel	La variation du poids corporel doit être minimale et ne pas dépasser ± 20% du poids moyen.	
Administration		
Voie d'administration	Gavage oral ou injection sous-cutanée	
Fréquence de l'administration	Une dose journalière	
Volume administré par gavage et injection	≤ 5ml/kg de poids corporel (ou jusqu'à 10 ml/kg de poids corporel dans le cas de solutions aqueuses) (sur 2 sites d'injection par voie sous-cutanée)	
Durée de la période d'administration	3 jours consécutifs pour le modèle sur animaux immatures Au minimum 3 jours consécutifs pour le modèle sur animaux ovariectomisés	7 jours consécutifs pour le modèle sur animaux ovariectomisés
Date du sacrifice	Environ 24 heures après la dernière dose	
Résultats		
Réponse positive	Augmentation statistiquement significative du poids moyen de l'utérus (frais et/ou séché)	
Oestrogène de référence	17α-éthinyloestradiol	

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRETATION ET L'ACCEPTATION DES RESULTATS

54. En général, un essai évaluant le pouvoir oestrogénique doit être considéré comme positif si l'on constate une augmentation statistiquement significative du poids utérin ($p < 0.05$) au moins chez le groupe traité avec la dose la plus élevée par rapport au groupe témoin qui a reçu le solvant. Un résultat positif est confirmé par la démonstration d'une relation biologiquement plausible entre la dose et l'ampleur de l'effet produit, sans perdre de vue que les effets oestrogéniques et antioestrogéniques conjugués du produit chimique testé peuvent modifier la forme de la courbe dose-effet.

55. Il importe de veiller à ne pas dépasser la dose maximale tolérée pour pouvoir interpréter avec profit les données. La réduction du poids corporel, les signes cliniques et les autres données observées devront être soigneusement évalués à cet effet.

56. Il est important, pour pouvoir accepter les données du bio-essai utéro-trophique de considérer les poids utérins des animaux du groupe témoin qui a reçu le véhicule. Des valeurs témoins élevées peuvent compromettre la réactivité du bio-essai et sa capacité de détection des agonistes des oestrogène de faible puissance. L'étude des données issues de la littérature et des données obtenues lors de la validation du bio-essai utéro-trophique semblent montrer que les moyennes de référence peuvent être élevées spontanément, en particulier chez les animaux immatures (2)(3)(6)(9). Le poids utérin des rates immatures dépend de nombreuses variables, notamment de la souche ou du poids corporel, c'est pourquoi aucune limite supérieure précise ne peut être indiquée pour le poids utérin. A titre indicatif, si le poids des utérus séchés des rates immatures du groupe témoin est compris entre 40 et 45 mg, les résultats peuvent être considérés comme suspects et des poids utérins supérieurs à 45 mg peuvent nécessiter de refaire l'essai. Il conviendra cependant de procéder à une évaluation au cas par cas (3) (6) (8). Dans l'essai sur des rates adultes, toute ovariectomie incomplète peut laisser des tissus ovariens susceptibles de produire des oestrogènes endogènes et de retarder la régression du poids utérin.

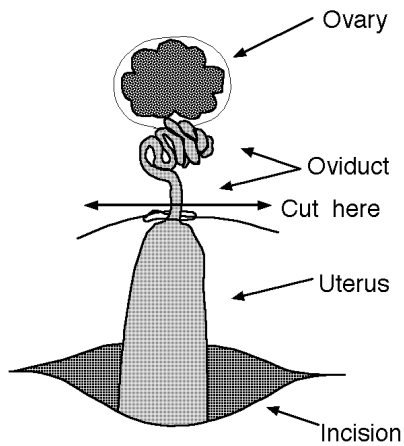
57. Pour les groupes témoins qui ont reçu le véhicule, l'obtention d'utérus séchés de poids inférieurs à 0.09% du poids corporel pour les rates immatures et à 0.04% pour les jeunes adultes ovariectomisées semble donner des résultats acceptables [voir tableau 31 (2)]. Si les poids utérins de référence sont supérieurs à ces valeurs, plusieurs facteurs doivent être vérifiés, notamment l'âge des animaux, la qualité de l'ovariectomie, les phytoestrogènes présents dans l'alimentation, et tout résultat négatif (pas d'indication d'activité oestrogénique) devra être considéré avec prudence.

58. Les données historiques concernant les groupes témoins qui ont reçu le véhicule doivent être conservées dans le laboratoire. Les données historiques concernant les effets des oestrogènes témoins positifs, tels que le 17α -éthynylestradiol, doivent aussi être conservées dans le laboratoire. Les laboratoires peuvent aussi tester les effets d'agonistes d'oestrogènes connus pour leur faible activité. Toutes ces données peuvent être comparées aux données dont on dispose (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) pour s'assurer que la sensibilité des méthodes du laboratoire est suffisante.

59. Lors l'étude de validation de l'OCDE, la variabilité pondérale est apparue plus faible pour les utérus séchés que pour les utérus frais (6) (7). Toutefois, on considère qu'une réponse significative dans l'un ou l'autre cas indiquera que la substance d'essai est positive (activité oestrogénique).

60. La réponse utéro-trophique n'est pas uniquement d'origine oestrogénique mais, s'il s'avère positif, le bio-essai utéro-trophique devra généralement être interprété comme preuve d'une activité oestrogénique potentielle *in vivo*, et devra normalement donner lieu à recherches plus poussées (voir le paragraphe 9 et le « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens », annexe 2).

Figure 1 : Schéma de l'ablation chirurgicale des ovaires



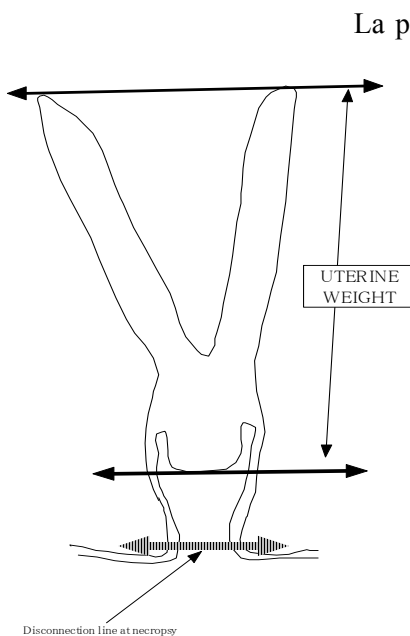
Mesometrium, vasculature
and fat pad not shown

Mésomètre, réseau vasculaire
et couche graisseuse non représentés

La procédure commence en ouvrant la paroi abdominale dorso-latérale au point médian entre la limite costale inférieure et la crête iliaque, et à quelques millimètres de la marge latérale du muscle lombaire. Les ovaires sont localisés dans la cavité abdominale. Sur un champ aseptique, on extrait les ovaires de la cavité abdominale, on pose une ligature entre l'ovaire et l'utérus pour arrêter le saignement, puis on détache l'ovaire par incision au-dessus de la ligature à la jonction de l'oviducte et de chaque corne utérine. Après avoir vérifié qu'aucun saignement important ne persiste, la paroi abdominale doit être recousue, et la peau refermée par des autoclips ou par suture, par exemple. On laisse ensuite les animaux se rétablir et le poids de l'utérus régner pendant au moins 14 jours avant utilisation.

Légende du schéma : Ovaire/Oviducte/Sectionner
ici/Utérus/Incision

Figure 2 : Prélèvement et préparation des tissus utérins avant pesée



La procédure commence par l'ouverture de la paroi abdominale au niveau de la symphyse pubienne. On détache chaque ovaire, s'ils sont présents, et chaque corne utérine de la paroi abdominale dorsale. La vessie et les uretères sont dégagés de la face ventrale et latérale de l'utérus et du vagin. Les adhérences fibreuses entre le rectum et le vagin sont libérées jusqu'à ce que l'on repère la jonction de l'orifice vaginal et du périnée. L'utérus et le vagin sont détachés du corps par incision de la paroi vaginale juste au-dessus de la jonction du périnée comme indiqué sur la figure. L'utérus doit être détaché du corps en découpant soigneusement le mésentère à son point d'attache sur toute la longueur de la façade dorso-latérale de chaque corne utérine. Après prélèvement, on élimine la graisse excédentaire et le tissu conjonctif. S'ils sont présents, les ovaires sont détachés de l'oviducte en évitant l'écoulement de fluide luminal de la corne utérine. Si l'animal a été ovariectomisé, les cicatrices doivent être examinées pour repérer l'éventuelle présence de tissu ovarien. Le vagin est détaché de l'utérus à la base du col de l'utérus pour que celui-ci reste solidaire du corps utérin comme l'indique la figure. L'utérus peut alors être pesé.

Légende du schéma : Poids utérin / Trait de section à la
nécropsie

ANNEXE 1**DEFINITIONS**

Pouvoir antioestrogénique : capacité d'un produit chimique à supprimer l'action de l'estradiol-17 β chez les mammifères.

Date de naissance : jour 0 après la naissance.

Dosage : terme général recouvrant la dose, la fréquence d'administration et la durée d'administration.

Dose : quantité de substance d'essai administrée. Dans le bio-essai utéro-trophique, la dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience par jour (mg/kg de poids corporel/jour).

Dose maximale tolérée (DMT) : quantité maximale d'une substance qui, lorsqu'elle est introduite dans le corps, n'est pas fatale aux animaux d'expérience (indiquée par la DL₀) (UICPA, 1993)

Pouvoir oestrogénique : capacité d'un produit chimique à agir comme l'oestradiol-17 β chez les mammifères.

Jour X (après la naissance) : Xème jour de vie après le jour de la naissance.

Sensibilité : proportion de toutes les substances positives/actives correctement classées par l'essai. Elle mesure l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriques, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Spécificité : proportion de toutes les substances négatives/inactives correctement classées par l'essai. Elle mesure l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriques, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Utéro-trophique : terme utilisé pour décrire une influence positive sur la croissance des tissus utérins.

Validation : procédure scientifique destinée à caractériser les exigences et limitations opérationnelles d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et son applicabilité à une fin donnée.

ANNEXE 2

Note : Document préparé par le Secrétariat du Programme sur les lignes directrices à partir de l'accord conclu à la 6^{ème} réunion du Groupe d'étude sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA)

Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens

<p>Niveau 1 Triage et hiérarchisation des priorités à la lumière des informations existantes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - propriétés physiques et chimiques, par exemple poids moléculaire, réactivité, volatilité, biodégradabilité - exposition des êtres humains et de l'environnement, par exemple volume de production, rejet, modes d'utilisation - dangers, par exemple données toxicologiques disponibles 	
<p>Niveau 2 Essais in vitro fournissant des données mécanistiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> - affinité de liaison aux récepteurs des oestrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes - activation de la transcription - genèse de l'aromatase et des stéroïdes in vitro - reconnaissance/fixation sur le récepteur des hydrocarbures aromatiques - relations quantitative structure activité (QSAR's) 	<ul style="list-style-type: none"> - dépistages préliminaires à haut débit - fonction thyroïdienne - essai sur la vitellogénine des hépatocytes du poisson - autres, selon les besoins
<p>Niveau 3 Essais in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme et effet endocrinien</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Essai utérotrrophique (oestrogènes) - Essai de Hershberger (androgènes) - fonctions hormonales non médiées par des récepteurs - autres fonctions (par exemple thyroïdienne) 	<ul style="list-style-type: none"> - essai sur la vitellogénine du poisson (oestrogènes)
<p>Niveau 4 Essais in vivo livrant des données sur plusieurs mécanismes et effets endocriniens</p>	<ul style="list-style-type: none"> - LD 407 affinée (indicateurs (d'effets) commandés par des mécanismes endocriniens) - essais de puberté chez les mâles et les femelles - essai sur l'adulte mâle intact 	<ul style="list-style-type: none"> - essai histopathologique sur les gonades des poissons - essai sur la métamorphose des grenouilles
<p>Niveau 5 Essais in vivo fournissant des données sur des effets mettant en jeu des mécanismes endocriniens et d'autres mécanismes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - étude de toxicité pour la reproduction sur une génération (LD 415 affinée)¹ - étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations (LD 416 affinée)¹ - essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (LD 421 affinée)¹ - étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (LD 422 affinée)¹ <p><small>¹ Les améliorations éventuelles seront examinées par le Groupe de gestion de la validation des essais sur les mammifères (VMG mammals).</small></p>	<ul style="list-style-type: none"> - essais portant sur une partie ou la totalité du cycle de vie des poissons, oiseaux, amphibiens et invertébrés (développement et reproduction)

Notes se rapportant au cadre conceptuel

Note 1 : Il est possible d'entrer dans le cadre et d'en sortir à tous les niveaux, suivant la nature des informations nécessaires.

Note 2 : Le niveau 5 relatif à l'écotoxicologie devrait inclure des indicateurs mettant en évidence le mode d'action des effets néfastes et d'éventuels dégâts au niveau des populations.

Note 3 : S'il existe un modèle multimodal couvrant plusieurs des essais fournissant des données sur un seul indicateur, ce modèle doit remplacer ces essais.

Note 4 : L'évaluation de chaque substance chimique est à effectuer au cas par cas, à la lumière de toutes les informations disponibles et compte tenu de la fonction des niveaux du cadre.

Note 5 : La version actuelle du cadre ne doit pas être considérée comme exhaustive. Aux niveaux 3, 4 et 5, il inclut des essais déjà disponibles ou en cours de validation. Ces derniers sont provisoirement inclus; ils seront confirmés une fois mis au point et validés.

Note 6 : La portée des essais du niveau 5 n'est pas strictement limitée. Les essais incorporés à ce niveau servent à l'évaluation des dangers et des risques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1998). Rapport de la première réunion du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA), 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OCDE (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: résumé de la documentation disponible à l'appui du projet du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA) en vue de normaliser et valider le bio-essai utéro-trophique. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OCDE (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay - Phase 1. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OCDE (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 - Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two - Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogène analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -oestradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369-373.
- (16) OCDE (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OCDE (2001). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 425.
- (25) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 - 333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 - 41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 - 305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 – 291.
- (31) OCDE (1982). Organisation de coopération et de développement économiques - Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization.* New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.
- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health.* 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using *in vitro* assay. *J. Agric Food Chem.* 52, 1410-1414.