

*OECD Guideline for Testing of Chemicals*Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement remises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques et des considérations relatives au bien-être animal. Une première LD 403 sur la toxicité aiguë par inhalation a été adoptée en 1981. La mise au point d'une méthode de la concentration inhalée prédéterminée semblait opportune, suite à l'adoption d'une méthode de la dose orale prédéterminée révisée (Ligne directrice de l'OCDE n°420) en décembre 2001 et de la suppression de la LD sur l'essai de toxicité orale (LD 401 de l'OCDE). La présente Ligne directrice permet de recourir à une série de concentrations prédéterminées pour évaluer la toxicité aiguë par inhalation chez un seul sexe.

2. Les méthodes traditionnelles d'évaluation de la toxicité aiguë ne prennent en compte que la mort ou l'état moribond des animaux comme point limite. En 1984, la Société britannique de toxicologie a proposé une nouvelle approche pour les essais de toxicité aiguë qui repose sur une administration des produits chimiques d'essai à plusieurs concentrations prédéterminées [1]. Cette approche permettait d'éviter d'utiliser la mort ou l'état moribond des animaux comme seul point limite ou comme point limite attendu, en considérant les signes cliniques de toxicité manifeste à l'une des doses prédéterminées comme point limite justifiant une classification du produit chimique d'essai concerné. La présente Ligne directrice reprend cette approche. Conformément au document d'orientation de l'OCDE sur les effets sur l'homme [2] et aux définitions qu'il contient, des précisions ont été apportées pour réduire autant que possible la souffrance et la détresse des animaux, ainsi que le nombre d'animaux utilisés. La toxicité manifeste décrit de façon générale les signes clairs de toxicité qui apparaissent suite à un traitement avec un produit chimique d'essai et qui laissent penser qu'une concentration plus élevée causerait une douleur aiguë et des signes prolongés de grande détresse, un état moribond ou une mort probable chez la plupart des animaux. On trouvera des recommandations pour reconnaître la toxicité manifeste chez Sewell et al. (2015) [3]. Le niveau de toxicité manifeste est atteint lorsqu'au moins un animal montre l'un des signes suivants (à partir du jour suivant le traitement) : tremblements, léthargie, respiration irrégulière ou perte de poids (> 10 % comparé au poids avant traitement). En cas de doute sur la présence de toxicité manifeste, la toxicité peut être considérée comme non évidente et des essais supplémentaires doivent être envisagés. Les propriétés statistiques de la méthode de la concentration prédéterminée ont été étudiées grâce à des modèles mathématiques [4-6].

© OCDE (2018)

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

Selon la décision du conseil de déléguer son autorité pour les amendements à l'Annexe I de la Décision du Conseil sur l'Acceptation Mutuelle des Données dans l'évaluation des produits chimiques [c(2018)49], cette Ligne directrice a été approuvée par la Réunion conjointe du comité des produits chimiques et le groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie, par procédure écrite le 25 juin 2018.

3. On trouvera dans le document d'orientation n°39 [7] des recommandations pour réaliser et interpréter des essais de toxicité aiguë par inhalation.
4. Les définitions utiles pour la présente Ligne directrice sont fournies dans le document d'orientation n°39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation [7].
5. La méthode fournit des informations sur les propriétés dangereuses des produits chimiques d'essai et permet de classer ces derniers selon le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) de l'ONU applicable aux produits chimiques qui causent une toxicité aiguë [8].

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

1. Il revient au laboratoire d'essai de prendre en compte toutes les informations disponibles sur le produit chimique d'essai avant les tests. Ces informations contiendront l'identité et la structure chimique du produit chimique d'essai ; ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous les autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo* avec ce produit chimique ; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées ; les utilisations attendues du produit chimique d'essai et le risque d'exposition humaine. Certaines de ces informations aideront à choisir une concentration initiale appropriée (par exemple, à partir de données croisées relatives à la toxicité de produits chimiques structurellement apparentés ou de produits de la même classe chimique, ou encore des données issues de logiciels de prédiction), ou à décider de ne pas mener d'essai supplémentaire si les informations existantes sont suffisantes. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données dans un but réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

2. Le principe fondateur de la méthode est que seules les concentrations modérément toxiques sont utilisées, de sorte que seule la « toxicité manifeste » (voir la description détaillée ci-dessous) soit le point limite, au lieu de la mort ou l'état moribond. Les concentrations supposées mortelles ne sont pas testées. De plus, les concentrations susceptibles de causer une douleur ou une souffrance aiguës, à cause d'un mécanisme corrosif¹ ou gravement irritant, ne sont pas testées. Pour les essais portant sur des produits chimiques irritants ou corrosifs, se reporter aux recommandations du document d'orientation n°39 [7]. Les animaux moribonds, ou dont les douleurs ou souffrances sont aiguës et prolongées, doivent être euthanasiés et considérés, dans l'interprétation des résultats, de la même manière que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et des indications sur les signes permettant de reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un document d'orientation séparé de l'OCDE [2].

¹ À déterminer avec une méthode d'essai validée (LD 430 ou 431, par exemple) ou à l'aide d'une prédiction acceptable.

3. Des cohortes d'animaux d'un même sexe sont exposées pendant une courte période au produit chimique d'essai suivant une procédure séquentielle, avec les concentrations prédéterminées appropriées pour les vapeurs, les poussières/brouillards (aérosols) ou gaz, conformément à l'Annexe 1. La concentration initiale est déterminée sur la base d'informations existantes ou d'une étude préliminaire à la concentration susceptible de produire une toxicité manifeste, c'est-à-dire des signes clairs de toxicité sans effets toxiques graves ou mortalité, mais qui laissent penser qu'une concentration plus élevée causerait une toxicité sévère ou la mort/l'état moribond pour la plupart des animaux. L'analyse proposée par Stallard et al. (2011) fournit des explications sur l'étude préliminaire [6]. On trouvera des recommandations pour reconnaître la toxicité manifeste dans la section 41 du présent document et chez Sewell et al. (2015) [3]. On notera que la « toxicité manifeste » est visible avant les signes cliniques et les marques associés à la douleur, la souffrance et la mort imminente, points limites décrits dans le document d'orientation de l'OCDE sur les effets sur l'homme [2]. Ce document décrit les signes et marques qui indiquent chez les animaux que le niveau de toxicité manifeste a été dépassé. D'autres cohortes d'animaux peuvent être testées à des concentrations supérieures si aucun signe de toxicité manifeste n'est observé à une concentration moindre.

4. Ce mode opératoire est poursuivi jusqu'à ce que soit atteinte une concentration qui provoque une toxicité manifeste ou la mort/l'état moribond d'un seul animal, lorsqu'aucun effet n'est observé à la concentration maximale, ou encore si des morts/états moribonds sont observés à la concentration la plus basse. En fonction du résultat de l'essai (c'est-à-dire, toxicité manifeste ou mortalité/état moribond), un unique essai à une seule concentration peut suffire à juger de la toxicité aiguë du produit chimique d'essai. La toxicité manifeste est définie comme des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'un produit chimique d'essai. Ces signes doivent laisser penser qu'une augmentation de la dose administrée entraînerait l'apparition de douleurs aiguës et des signes prolongés de grande détresse, un état moribond et probablement la mort pour la plupart des animaux. L'analyse de Sewell et al. (2015) [3] a démontré que le niveau de toxicité manifeste est atteint lorsqu'un ou plusieurs animaux montre l'un ou l'autre des signes suivants (à partir du jour suivant le traitement) : tremblements, léthargie, respiration irrégulière ou perte de poids (> 10 % comparé au poids avant traitement). Cependant, l'analyse comprend aussi des informations sur des signes plus rarement observés qui ont une forte valeur prédictive. Ces recommandations doivent être conjuguées à l'expérience et au jugement du directeur de l'essai. Pour plus de recommandations, consulter le document d'orientation n°39 [7].

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix de l'espèce animale

5. L'espèce de choix parmi les rongeurs est le rat, mais d'autres rongeurs peuvent éventuellement être utilisés. Le choix d'utiliser d'autres espèces de rongeurs ou d'autres animaux que les rongeurs doit être expliqué. Si disponibles, les informations existantes peuvent être utilisées, ou une étude préliminaire réalisée sur un mâle et une femelle, pour choisir le sexe le plus sensible à utiliser dans l'essai principal [6]. Mener cette étude préliminaire n'est pas obligatoire. L'étude préliminaire a pour objectif principal de choisir une concentration initiale appropriée pour l'essai principal, mais elle peut aussi participer au choix du sexe. Par défaut, on utilisera des mâles si aucune différence de sensibilité n'apparaît, les femelles ne seront utilisées que si elles apparaissent plus sensibles que les mâles. Cependant, les connaissances actuelles sur les propriétés toxicologiques ou toxicocinétiques de produits chimiques structurellement apparentés doivent aussi être prises en compte et le choix du sexe doit être dûment justifié.

6. On utilisera des animaux adultes sains provenant de souches couramment utilisées en laboratoire. Si l'on utilise des femelles, il faut qu'elles soient nullipares et non gravides. Lors de l'application de la première dose, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et d'un poids de $\pm 20\%$ le poids moyen *des animaux utilisés précédemment*.

Conditions d'encagement et d'alimentation

7. La température de l'animalerie d'expérimentation est maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Idéalement, le taux d'humidité relative devrait se situer entre 45 et 65 pour cent, et doit atteindre au moins 30 pour cent et ne pas dépasser 70 pour cent, de préférence, sauf pendant le nettoyage du local. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Une alimentation à satiété doit être fournie, si possible. Les animaux sont regroupés en cage par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

Préparation des animaux

8. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, les animaux sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum cinq jours avant le début de l'essai. Sélectionnés au hasard, les animaux utilisés sont marqués pour être identifiés individuellement.

Méthode d'exposition

9. Les animaux sont exposés au produit chimique présenté sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Deux modes d'exposition, « tête/nez seul » et « corps entier », peuvent être utilisés. Le mode d'exposition « tête/nez seul » réduit l'exposition et l'absorption par d'autres voies que l'inhalation et permet de tester des animaux individuellement à de fortes concentrations, comme prévu dans les limites des essais, sans utiliser de grandes quantités de produit. Ce mode présente aussi les avantages suivants : maintien facilité de l'homogénéité de l'atmosphère d'essai, moindre potentiel d'instabilité chimique pendant l'essai (réaction avec des excréments humidité), homogénéisation plus rapide de l'atmosphère due au moindre volume nécessaire. Cependant, la technique « tête/nez seul » implique d'appliquer des mesures de contention aux animaux pendant toute la durée de l'exposition. Cela n'est pas nécessaire pour l'exposition « corps entier ». Le mode « tête/nez seul » cause donc un stress accru comparé au mode « corps entier ». En revanche, il est plus aisé de libérer un animal en souffrance du mode « nez seul » que d'une chambre « corps entier ». Le mode d'exposition choisi doit avoir pour but de réduire au minimum la douleur, la détresse ou la souffrance des animaux, conformément aux objectifs scientifiques de l'étude [2].

Technique d'exposition « tête/nez seul »

10. Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai à l'aide de tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer de stress excessif chez les animaux, ils doivent être conçus pour éviter le stress par hyperthermie tout en ne permettant pas à l'animal d'éviter l'exposition par l'appareil respiratoire. Toutefois, s'il est impossible d'éviter un solde négatif des volumes d'air entrant et sortant, il convient d'éviter la dilution de l'atmosphère d'essai due au déséquilibre du débit d'air (via le tube de contention). Pendant son fonctionnement, la chambre d'inhalation doit être placée sous une hotte adéquatement ventilée. Les animaux doivent être soumis à l'essai dans un dispositif d'inhalation conçu pour maintenir un débit d'air continu dépassant au moins du double le volume

de ventilation respiratoire de tous les animaux dans le dispositif d'inhalation. Un contenu en oxygène adéquat, d'au moins 19 %, une concentration en dioxyde de carbone ne dépassant pas 1 % et des conditions d'exposition similaires d'un tube d'exposition à un autre, doivent être garantis. Lors du recueil d'échantillons de l'atmosphère d'essai, on évitera toute perturbation significative du débit d'air. Le débit d'air doit être adapté pour que les conditions soient similaires dans tout l'équipement. Le document d'orientation n°39 [7] décrit les principes de la technique d'exposition « nez seul », ainsi que ses avantages et inconvénients spécifiques.

Mode d'exposition « corps entier »

11. Les animaux sont testés avec un dispositif d'inhalation conçu pour maintenir un débit d'air continu d'environ 12 à 15 changements d'air par heure. En fonction des exigences qui s'imposent avec le produit chimique d'essai, d'autres débits d'air peuvent mieux convenir. Dans tous les cas, un contenu en oxygène adéquat, d'au moins 19 %, une concentration en dioxyde de carbone ne dépassant pas 1 % et une répartition uniforme dans l'air, doivent être garantis. En règle générale, pour garantir la stabilité de l'atmosphère dans la chambre, le volume total occupé par les animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai. Le document d'orientation n°39 [7] décrit les principes de la technique d'exposition « corps entier », ainsi que ses avantages et inconvénients spécifiques.

Conditions d'exposition

12. Il est recommandé une durée fixe d'exposition de quatre heures, sans compter le temps d'équilibration. D'autres durées d'exposition sont possibles pour répondre à des besoins spécifiques.

13. Pour définir les concentrations d'exposition adaptées, il est obligatoire de réaliser un essai technique préliminaire sans animaux. Il est techniquement difficile de produire avec précision une atmosphère d'essai à une concentration d'exposition prédéterminée. Par conséquent et pour éviter des répétitions non nécessaires des essais, on veillera à ce que les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Dans le cas de produits chimiques d'essai potentiellement explosifs, des précautions doivent être prises pour éviter les conditions favorisant les explosions. On trouvera plus de recommandations dans le document d'orientation n°39 [7].

Granulométrie

14. Il est difficile de prédire la région la plus sensible de l'appareil respiratoire ou la taille de particules la plus dangereuse. En conséquence, la répartition granulométrique des poussières et aérosols doit permettre d'exposer toutes les régions de l'appareil respiratoire. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) est $\leq 4\ \mu\text{m}$, avec un écart-type géométrique compris entre 1,5 et 3,0 [10]. Dans le cas où un laboratoire utiliserait des particules d'un DAMM différent de celui recommandé, ce choix doit être expliqué et justifié. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide du tractus respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Production des atmosphères d'essai

15. Si nécessaire, pour atteindre la concentration et la respirabilité appropriées du produit chimique d'essai, on pourra avoir recours à un véhicule. Si un véhicule est utilisé pour atteindre la

concentration appropriée du produit chimique d'essai dans l'atmosphère, la toxicité aiguë par inhalation du véhicule doit être connue. Un groupe témoin pour le véhicule (ou tout autre témoin) n'est pas nécessaire pour les véhicules bien caractérisés. Les substances particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer le produit chimique et la composition de ce produit devra être vérifiée analytiquement, car les procédés mécaniques extrêmes peuvent altérer la répartition granulométrique des matériaux intacts. On prendra soin de ne pas contaminer le produit chimique d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

16. Le débit d'air dans la chambre est surveillé en continu et enregistré trois fois au minimum pendant chaque exposition.

Température de la chambre d'exposition

17. La température de l'air dans la zone où respire l'animal est surveillée en continu et enregistrée trois fois au minimum pendant chaque exposition. Dans l'idéal, la température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Tout écart en dehors de cette plage doit faire l'objet d'une note, ainsi que d'une évaluation des éventuels effets sur le résultat de l'exposition.

Humidité relative de la chambre d'exposition

18. Dans le cas d'expositions « tête/nez seul » et « corps entier », l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est surveillée en continu et enregistrée trois fois pendant chaque exposition, si possible. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque le produit chimique d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences du produit chimique d'essai avec la méthode d'essai.

Concentration du produit chimique d'essai

19. Dans les cas d'exposition « tête/nez seul » et « corps entier », la concentration réelle est la concentration du produit chimique d'essai dans la zone où les rats respirent. Pendant la période d'exposition, la concentration réelle du produit chimique d'essai est maintenue aussi constante que possible (voir paragraphe 17) et vérifiée soit en continu, soit de façon intermittente suivant la méthode d'analyse. Lorsque les échantillons sont prélevés de façon intermittente, au moins cinq échantillons sont recueillis à intervalles d'environ une heure. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un nombre inférieur d'échantillons est acceptable, avec au minimum un échantillon pour toute la période d'exposition. Dans le cas d'aérosols solides ou de liquides mono-constituants présentant une volatilité extrêmement faible, une analyse gravimétrique est acceptable. Lors du recueil d'échantillons gravimétriques aux concentrations d'exposition les plus élevées de l'essai, on prendra soin d'étalonner le débitmètre (compteur à gaz par voie sèche) utilisé pour évaluer le volume de l'échantillon en fonction de la baisse de pression dans le filtre (en tenant compte de l'équation pression x volume = constante). Pour chaque débitmètre ou compteur à gaz par voie sèche utilisé, on générera une courbe d'étalonnage du volume.

20. Pour les aérosols de produits liquides formulés pouvant être évaporés à poids constant, une analyse gravimétrique du résidu sec est acceptable. Une extrapolation appropriée pour calculer le poids du produit formulé doit être appliquée aux données gravimétriques. Si le mélange dans la zone de respiration de l'animal est analogue au produit formulé, il n'est pas nécessaire d'analyser les ingrédients inertes ; les éléments permettant de faire ce choix devront être consignés dans le rapport d'essai. En cas de difficultés pour mesurer la concentration analytique dans la chambre, dues à la présence de précipités, de mélanges non homogènes, de composants volatiles ou d'autres facteurs, il peut être nécessaire de réaliser une analyse supplémentaire des composants inertes.

21. Si une analyse gravimétrique n'est pas adaptée et que l'atmosphère d'essai contient plus d'un composant, l'analyse chimique du principal ingrédient actif puis l'application d'une extrapolation à la concentration du produit formulé peut être suffisante mais doit être expliquée.

22. Lorsque le produit chimique d'essai est un produit formulé, la concentration analytique n'est pas rapportée pour le seul ingrédient actif mais pour la formulation totale.

Répartition granulométrique

23. Une mesure de la répartition granulométrique est réalisée pour les aérosols au minimum deux fois pendant les quatre heures de traitement. Différents appareils d'échantillonnage peuvent être utilisés, mais l'appareil choisi doit permettre de calculer le DAMM (voir paragraphe 18). Le diamètre moyen géométrique peut être déterminé à l'aide d'un spectromètre de mobilité électrique (SMPS). Les principes ci-dessus s'appliquent aux aérosols multi-composants pour déterminer leur concentration. Des informations adéquates doivent être disponibles dans le laboratoire d'essai pour prouver que les instruments de prélèvement analysent des échantillons atmosphériques représentatifs de l'atmosphère à laquelle sont exposés les animaux.

Concentration nominale

24. La concentration nominale d'exposition dans la chambre est déterminée en enregistrant la quantité de produit chimique d'essai répartie dans le tube ou la chambre d'exposition pendant la période de génération, puis en divisant cette quantité par le débit d'air total ayant traversé le tube ou la chambre pendant cette même période.

PROCÉDURE

Étude préliminaire

25. Une étude préliminaire permet de choisir le sexe le plus sensible et de choisir la concentration initiale appropriée pour l'étude principale. Cependant, l'étude préliminaire peut ne pas être nécessaire si des informations existantes permettent d'orienter le choix de la concentration initiale et/ou du sexe le plus sensible. Cette étude ne doit donc pas être considérée comme obligatoire. Le produit chimique d'essai est administré simultanément à deux animaux (un mâle et une femelle), à une concentration initiale choisie et pour une durée d'au moins quatre heures. L'essai se poursuit de manière séquentielle et en fonction des résultats, conformément aux diagrammes de flux à l'Annexe 1 [6]. Si la même réponse est observée chez les deux animaux, à savoir mort, toxicité manifeste non mortelle ou absence d'effets, l'étude préliminaire peut être arrêtée ou être suivie d'un essai principal chez des mâles, ou bien est poursuivie chez deux animaux (un mâle et une femelle) à la concentration suivante. Si, à quelque concentration que ce soit, une différence entre les sexes est observée, l'essai principal sera mené chez le sexe le plus sensible et l'étude préliminaire est poursuivie chez ce sexe uniquement, de façon à déterminer la concentration initiale appropriée pour l'essai principal. L'étude préliminaire s'achève dès lors qu'il est possible de choisir la

concentration initiale pour l'essai principal, sur la base des signes de toxicité manifeste ou si l'on observe la mort/l'état moribond à la concentration prédéterminée la plus basse. Si aucune différence de sensibilité n'apparaît entre les sexes, on utilisera des mâles dans l'essai principal.

26. La concentration initiale pour l'étude préliminaire est choisie parmi les concentrations prédéterminées fournies à l'Annexe 1. Si possible et sur la base de preuves issues de données existantes relatives au même produit chimique et/ou à des produits chimiques analogues, cette concentration doit être susceptible de produire une toxicité manifeste. En l'absence de telles informations, la concentration initiale est de 10 mg/L, 1 mg/L ou 2500 ppm pour les produits se présentant sous la forme de vapeurs, poussières/brouillard d'aérosols et de gaz, respectivement.

27. Un intervalle de 24 heures au minimum est respecté entre deux essais sur chaque paire d'animaux. Tous les animaux sont normalement observés au moins une fois par semaine.

28. Si un animal testé à la concentration prédéterminée la plus faible dans l'étude préliminaire meurt ou montre des signes cliniques évidents de toxicité, la procédure ordinaire est de mettre fin à l'étude et de classer le produit chimique d'essai dans la Catégorie 1 du SGH [8] sans mener l'essai principal (voir Annexe 1). Cependant, s'il est jugé nécessaire de confirmer cette classification (c'est-à-dire, si la mort/l'état moribond n'est observé que pour un sexe), le mode opératoire optionnel suivant peut compléter l'étude. Un animal supplémentaire, du sexe le plus sensible, est soumis à l'essai à la plus faible concentration prédéterminée. Si cet animal meurt, la classification en Catégorie 1 du SGH est confirmée et l'étude prend fin immédiatement. Si l'animal survit, trois animaux supplémentaires au maximum sont soumis à l'essai à cette concentration. Étant donné le risque élevé de mortalité, ces animaux sont testés de façon séquentielle dans l'intérêt du bien-être animal. L'intervalle entre l'exposition de chaque animal doit être suffisamment long pour conclure que l'animal précédent a des chances de survivre. Si un animal supplémentaire meurt ou présente un état moribond, la séquence d'essai est immédiatement interrompue et aucun autre animal n'est soumis à l'essai. La classification suit les informations fournies à l'Annexe 1 : Catégorie 1 si deux morts/états moribonds ou plus sont observés (résultat A), Catégorie 2 si une mort/un état moribond est observé (résultat B).

ESSAI PRINCIPAL

Nombre d'animaux et concentrations

29. Les étapes à suivre après l'essai à la concentration initiale sont indiquées dans les diagrammes de flux à l'Annexe 1. En fonction du résultat de chaque étude, une des trois actions suivantes est requise : soit l'arrêt des essais et l'attribution de la classe de danger appropriée, soit un essai à une concentration prédéterminée supérieure, soit un essai à une concentration prédéterminée inférieure. Toutefois, pour éviter des souffrances animales inutiles, une concentration ayant provoqué la mort/l'état moribond dans l'étude préliminaire ne sera pas utilisée dans l'essai principal (voir Annexe 1). L'expérience montre que le résultat le plus probable à la concentration initiale sera de classer le produit chimique d'essai sans nécessité de procéder à un autre essai. Lors des essais sur une série décroissante, si 2 ou 3 morts sont observées (dans le cadre du résultat A), alors les essais sont interrompus dans l'intérêt du bien-être animal et le produit chimique d'essai est classé conformément au résultat C correspondant à la concentration suivante dans la série. On trouvera des recommandations pour reconnaître la toxicité manifeste (dans le cadre du résultat B) à la section 40 et chez Sewell et al. (2015) [3].

30. Au total, cinq animaux d'un sexe (le sexe le plus sensible identifié dans l'étude préliminaire, ou des mâles uniquement) sont normalement utilisés pour chaque concentration testée, en plus des paires d'animaux utilisées dans l'étude préliminaire.

31. L'intervalle de temps entre l'exposition à différentes concentrations est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Il est recommandé d'espacer de trois à quatre jours les expositions à chaque niveau de concentration afin de permettre l'observation d'une toxicité retardée. L'intervalle de temps peut être ajusté comme il convient, par exemple dans le cas d'un effet peu concluant.

Essai limite

32. L'essai limite est utilisé si le directeur de l'essai dispose d'informations laissant prévoir que le produit chimique d'essai sera non toxique, c'est-à-dire qu'il ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Des informations sur la toxicité du produit chimique d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des composés, produits ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si les informations disponibles sont lacunaires ou absentes sur la toxicité du produit chimique d'essai, ou s'il est susceptible d'être toxique, l'essai principal est réalisé.

33. En suivant la procédure ordinaire, une concentration initiale de l'essai principal de 20 mg/L, 5 mg/L ou 20 000 ppm pour les produits sous forme de vapeurs, d'aérosols ou de gaz, respectivement, puis de traiter cinq animaux supplémentaires à cette concentration est considéré comme l'essai limite pour présente Ligne directrice, si possible. Lors des essais portant sur des aérosols, l'objectif principal est d'obtenir des particules de taille respirable (à savoir, une DAMM $\leq 4 \mu\text{m}$). Cela est possible pour la plupart des produits chimiques d'essai à une concentration de 2 mg/L. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/L ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable. Dans certains cas et conformément aux exigences réglementaires, un essai est mené jusqu'à la limite de la Catégorie 5 du SGH. Cependant, les essais dans la Catégorie 5 du SGH (2000-5000 mg/kg) sont à éviter et ne doivent être envisagés que s'il est très probable que les résultats d'un tel essai présentent un intérêt direct pour la protection de la santé humaine [8].

Observations

34. Pendant la période de traitement, les animaux sont fréquemment observés. De plus, après le traitement, des examens cliniques minutieux sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement. Des observations cliniques sont ensuite réalisées au moins une fois par jour pendant un total de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants et doivent être enregistrés, notamment lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés. Toutes les observations sont consignées de façon systématique, une fiche individuelle est conservée pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et prolongée sont euthanasiés sans attendre. Quand les animaux sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal ou si on les trouve morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible. Les animaux euthanasiés sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai (dans le cadre d'un résultat A ou B).

35. D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes cliniques de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Si possible, on différenciera les effets locaux des effets systémiques. On prêter attention aux observations de tremblements, de convulsions, de salivation, de diarrhées, de léthargie, de respiration irrégulière, de sommeil, de coma et de perte de poids. On trouvera un lexique des signes cliniques pour les signes observables lors des essais de toxicité aiguë par inhalation chez Sewell et al. (2015) [3]. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets exempts de cruauté animale doivent être pris en considération [2]. Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves ou prolongés de détresse doivent être euthanasiés sans cruauté, dans l'intérêt du bien-être animal. Les animaux moribonds euthanasiés sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec les effets liés au traitement. Par conséquent, on considèrera avec précaution les signes observés le jour du traitement.

36. D'après les critères du résultat B, le niveau de toxicité manifeste est atteint lorsque un ou plusieurs animaux montrent l'un des signes suivants (à partir du jour suivant l'exposition) : tremblements, léthargie, respiration irrégulière ou perte de poids (> 10 % comparé au poids avant le traitement, c'est-à-dire le poids au premier jour de l'exposition, voir paragraphe 42). On trouvera des recommandations pour reconnaître la toxicité manifeste chez Sewell et al. (2015) [3], où les preuves issues d'un ensemble de données rétrospectives montrent que si l'un de ces signes est observé chez au moins un animal à partir du jour suivant l'exposition, on observe presque toujours la mort de deux animaux au moins à la concentration supérieure suivante. L'analyse fournit aussi des informations quant à des signes plus rarement observés qui ont une forte valeur prédictive et peuvent être pris en compte. Ces recommandations pour reconnaître la toxicité manifeste doivent être utilisées dans le cadre de la présente Ligne directrice, mais n'ont pas vocation à remplacer l'expérience et le jugement du directeur de l'essai. Elles constituent un guide uniquement. Si une toxicité sévère (y compris des signes non mentionnés explicitement ci-avant) est observée le jour de l'exposition ou à tout moment pendant l'essai, l'essai est interrompu et les animaux sont euthanasiés s'il le faut. Si l'on doit décider entre un résultat B et un résultat C en l'absence de mort, et si le directeur de l'essai juge que la toxicité manifeste observée n'est pas concluante (ce qui permettrait de trancher en faveur d'un résultat B), il est possible de réaliser un essai à la concentration limite supérieure suivante.

Poids corporel

37. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré au moins une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci et au moins les jours 1, 3, et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite), ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, une perte de poids > 10 % chez un animal comparé au poids au jour de l'exposition est un signe que le niveau de toxicité manifeste est atteint. Si la condition d'un animal est préoccupante, on mesure son poids corporel plus fréquemment. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période post-exposition.

Pathologies

38. Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude dans l'intérêt du bien-être animal) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements pathologiques macroscopiques relevés sur chaque animal sont notés. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie est possible, car il peut fournir des renseignements utiles.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

39. Des données individuelles sont à fournir pour chaque animal. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant pour chaque groupe d'essai le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou tués pour des raisons humanitaires, pour chaque animal le moment de la mort (ou le moment estimé de la mort si le moment exact n'est pas connu), la description des effets de la toxicité et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité et les résultats de l'autopsie.

Rapport d'essai

40. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants :

Produit chimique testé et substance de contrôle

- Source, numéro de lot et date limite d'utilisation, si c'est disponible ;
- Stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue ;
- Solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues ;
- Mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant;

Substance mono-constituant :

- Apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude ;
- Identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés, s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :

- Caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).

Animaux d'essai :

- Espèce/souche utilisée ;
- État microbiologique des animaux, s'il est connu ;
- Période d'acclimatation ;
- Nombre, âge et sexe des animaux (y compris, le cas échéant, la justification du remplacement des mâles par des femelles) ;
- Origine, conditions d'hébergement, données historiques, alimentation, etc. ;

Conditions de l'essai :

- Détails de la préparation du produit chimique, y compris détails sur les modes opératoires suivis pour réduire la taille des particules des poudres ou pour préparer les solutions de produits chimiques d'essai ;
- Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci ;
- Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air ;
- Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique ;
- Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et sur la méthode de validation (y compris rendement de récupération du produit chimique d'essai à partir du milieu d'échantillonnage) ;
- Détails sur la durée nécessaire pour atteindre l'équilibre de la concentration d'exposition avant le traitement de l'animal ;
- Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins ;
- Détails sur la qualité de nourriture et d'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau) ;
- Raisons du choix de la concentration initiale.

Résultats :

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation ;
- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation ;

- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de l'écart-type géométrique ;
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité et durée des effets) ;
- Poids individuels des animaux le jour de l'exposition, puis à intervalle d'une semaine et au moment de la mort ou de l'euthanasie ; date et heure de la mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue ; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité pour chaque animal et, le cas échéant, leur réversibilité ;
- Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.

Discussion et interprétation des résultats.

Si l'observation de toxicité manifeste n'était pas concluante et si un jugement a été nécessaire pour arriver au résultat, celui-ci doit être expliqué en détails dans la discussion. Si un essai supplémentaire a été mené, il doit être justifié.

Conclusions.

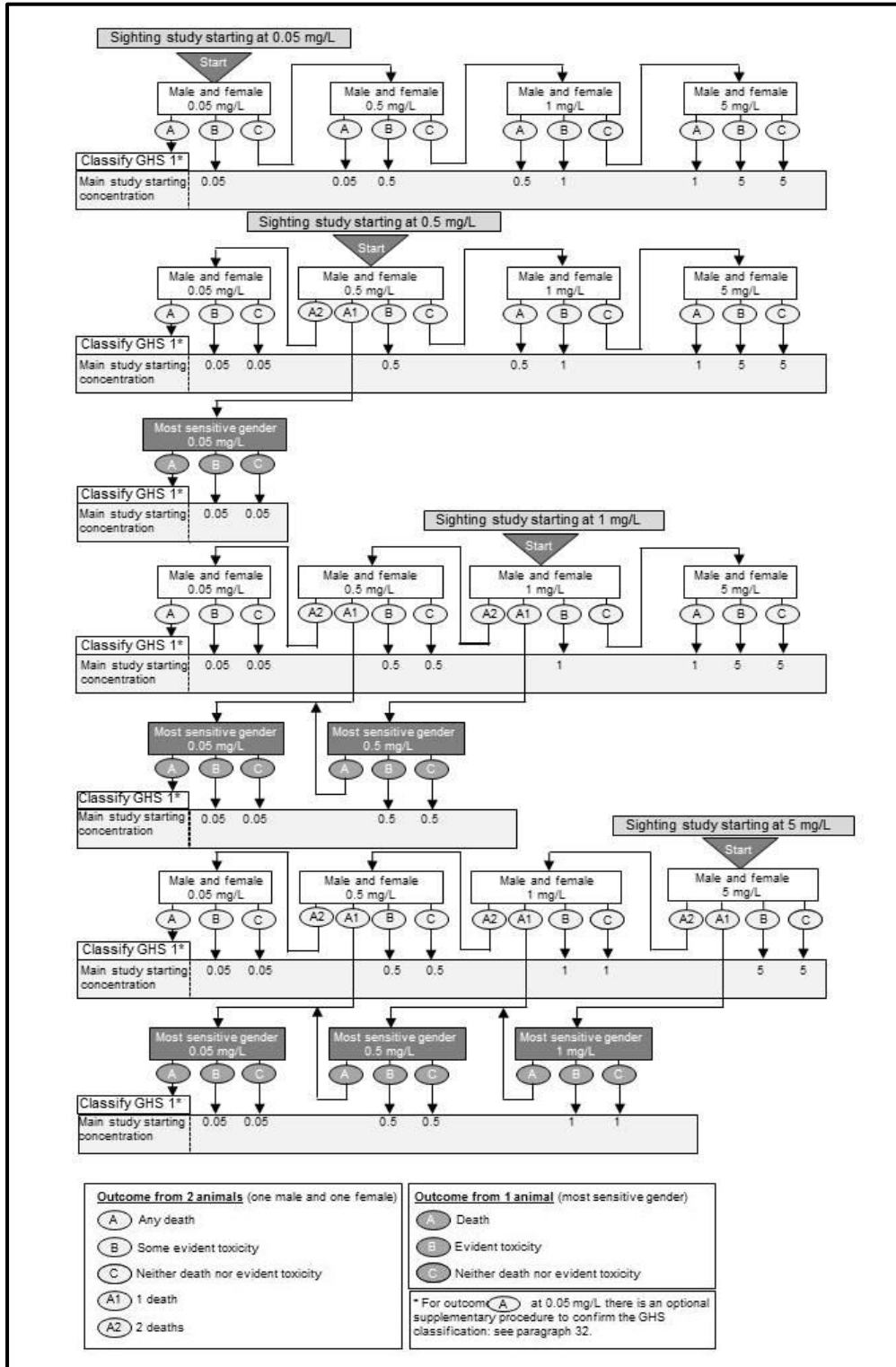
BIBLIOGRAPHIE

1. BTS, *A new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. A report by the British Toxicology Society working party on toxicity.* Hum Toxicol, 1984. 3(2): p. 85-92.
2. OECD, *Guidance Document No. 19 on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation.* ENV Publications. Series on Testing and Assessment. Paris. 2000.
3. Sewell, F., et al., *A global initiative to refine acute inhalation studies through the use of 'evident toxicity' as an endpoint: towards adoption of the Fixed Concentration Procedure.* Regul Toxicol Pharmacol, 2015. 73. 770-779.
4. Stallard, N., A. Whitehead, and I. Indans, *Statistical evaluation of the fixed concentration procedure for acute inhalation toxicity assessment.* Hum Exp Toxicol, 2003. 22(11): p. 575-85.
5. Price, C., et al., *A statistical evaluation of the effects of gender differences in assessment of acute inhalation toxicity.* Hum Exp Toxicol, 2011. 30(3): p. 217-38.
6. Stallard, N., et al., *A new sighting study for the fixed concentration procedure to allow for gender differences.* Hum Exp Toxicol, 2011. 30(3): p. 239-49.

7. OECD, *Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing*. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, Paris. 2009.
8. Nations Unies, *Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), s Sixième édition révisée, ST/SG/AC.10/30/Rev.6, New York and Genève, 2015, https://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_f.html#c38157*
9. Warbrick, E.V., et al., *The reduction and refinement of animal use in acute inhalation toxicity testing*. Toxicology, 2002. 192(1): p. 92.
10. van den Heuvel, M.J., et al., *The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test*. Food Chem Toxicol, 1990. 28(7): p. 469-82.

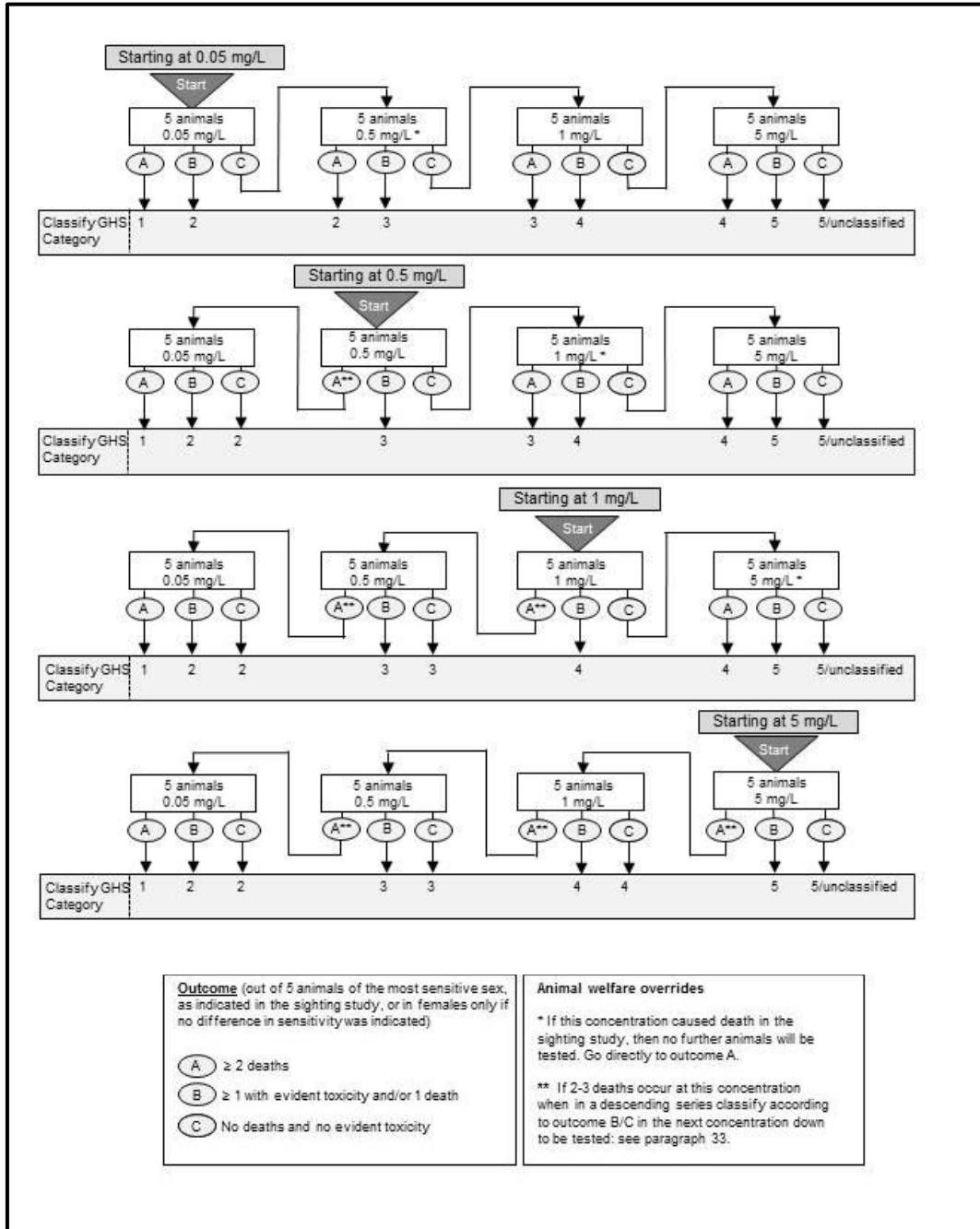
ANNEXE 1

Diagramme de flux pour l'étude préliminaire – poussières et brouillard d'aérosols



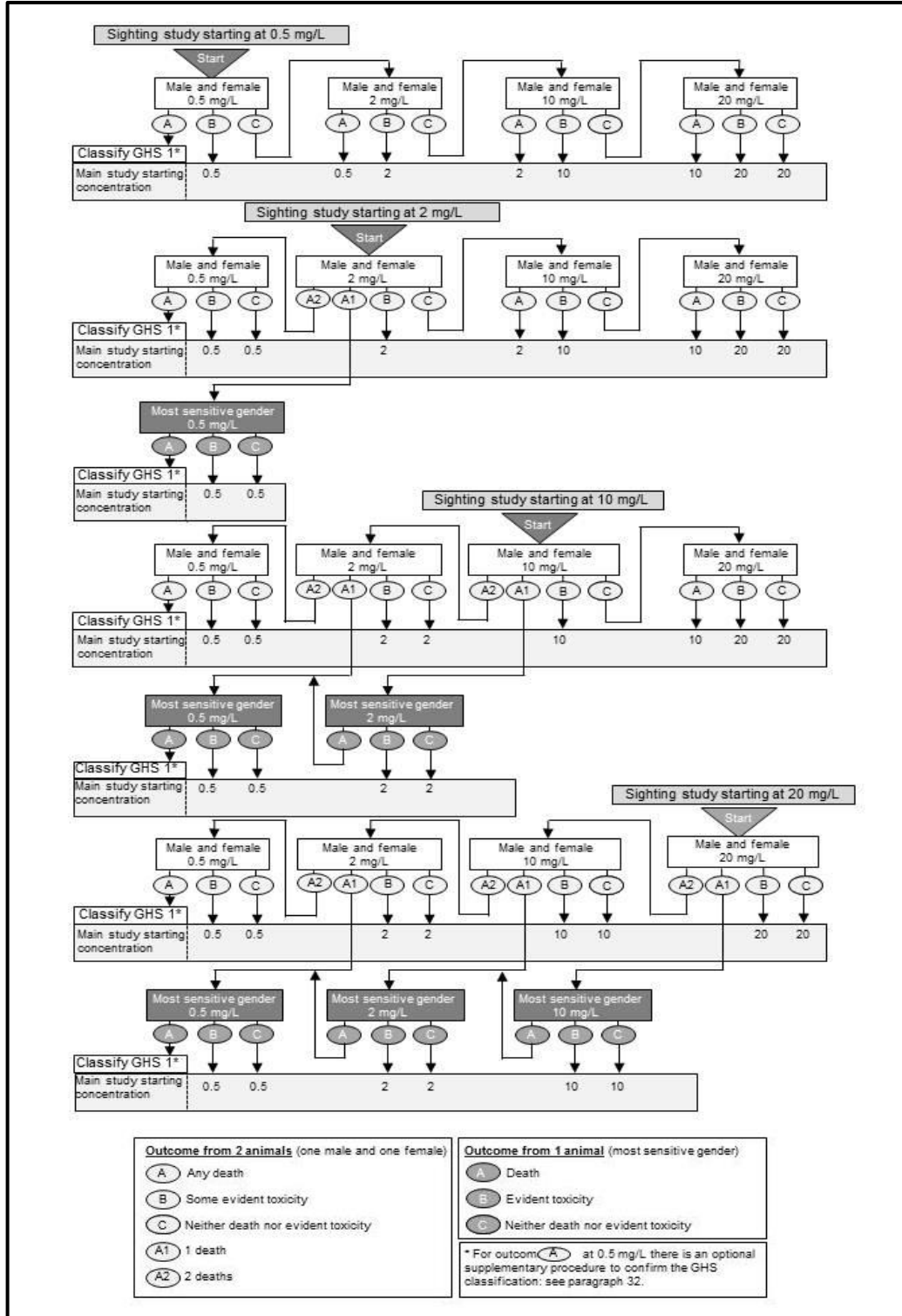
Annexe 1 (suite)

Diagramme de flux pour l'étude principale – poussières et brouillard d'aérosols



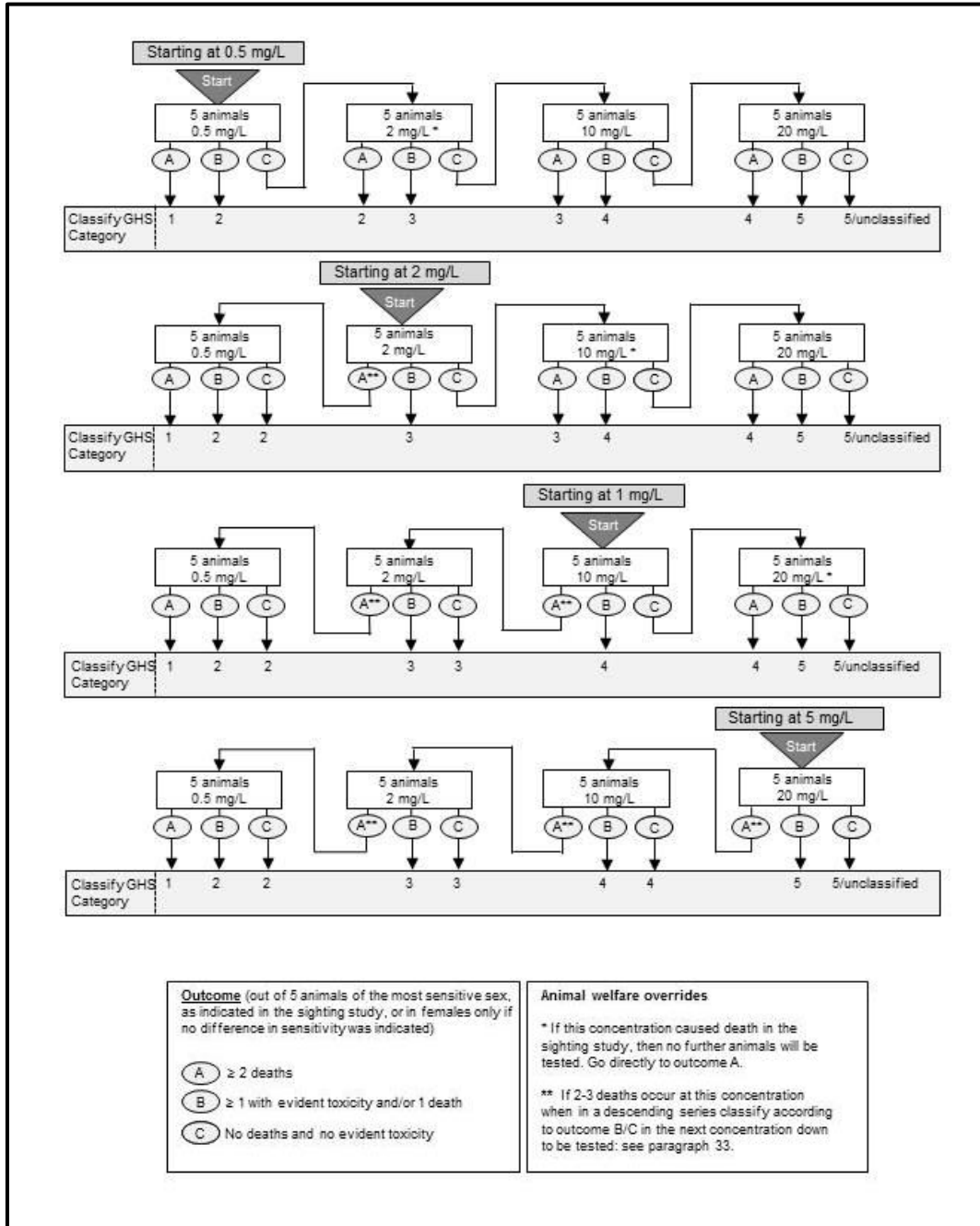
Annexe 1 (suite)

Diagramme de flux pour l'étude préliminaire – vapeurs



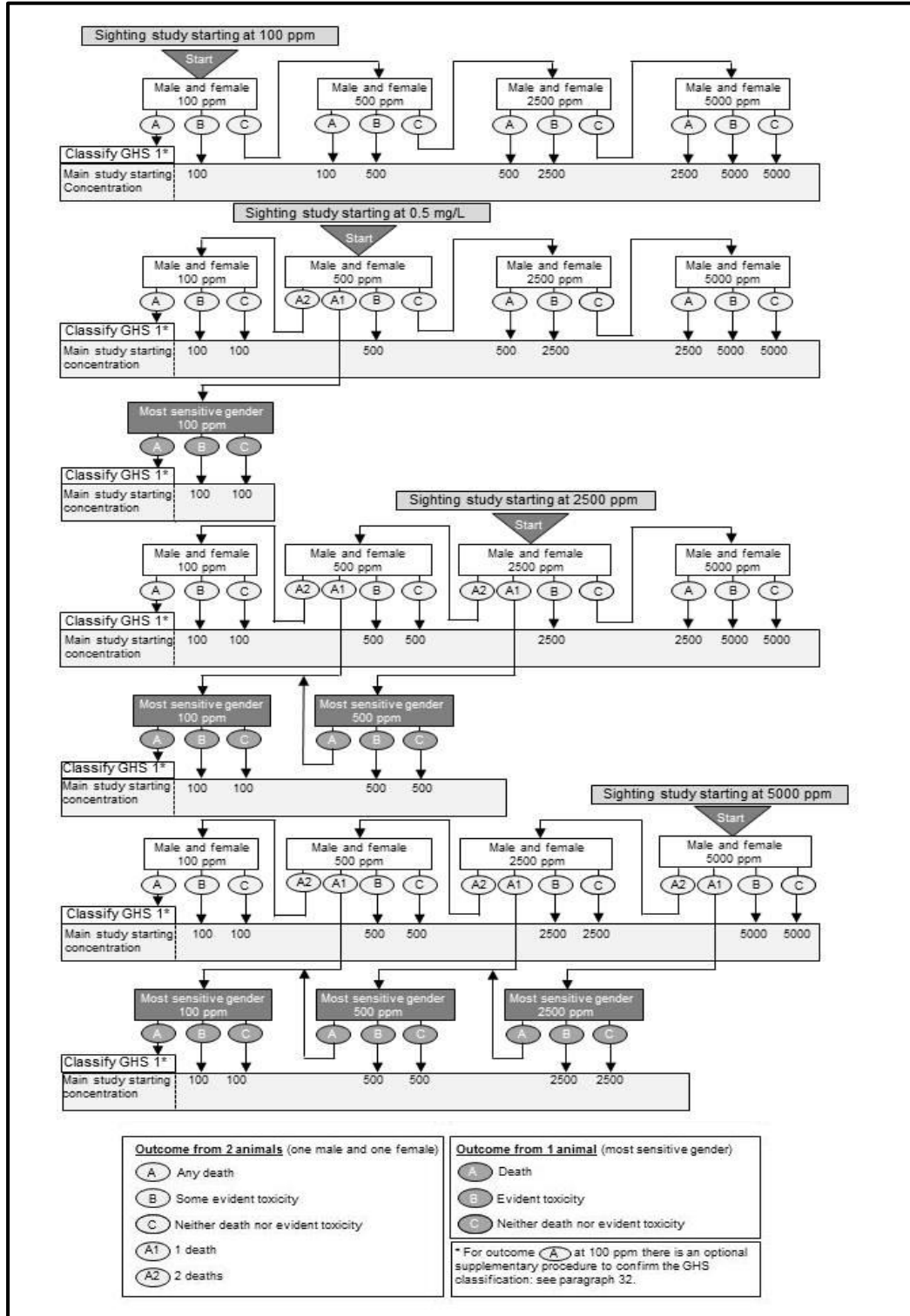
Annexe 1 (suite)

Diagramme de flux pour l'étude principale – vapeurs



Annexe 1 (suite)

Diagramme de flux pour l'étude préliminaire – gaz



Annexe 1 (suite)

Diagramme de flux pour l'étude principale – gaz

