

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

Sensibilisation cutanée : essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La Ligne directrice pour les essais (LD) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL; LD 429), a été adoptée à l'origine en 2002 (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). La révision de l'ELGL s'appuie sur l'évaluation de l'expérience acquise et des données scientifiques (12). Il s'agit de la deuxième Ligne directrice permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques chez les animaux. L'autre Ligne directrice (LD 406) fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL présente un avantage par rapport à la LD 406 (13) en termes de bien-être des animaux. Cette mise à jour de la Ligne directrice sur l'ELGL comprend une série de normes de performance (annexe 1) pouvant servir à évaluer l'état de validation des méthodes d'essai modifiées et/ou nouvelles, dont le fonctionnement et le mécanisme sont similaires à ceux de l'ELGL, conformément aux principes énoncés dans le Document d'orientation n° 34 (14).

2. L'ELGL s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et livre des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Il convient de noter que les sensibilisants légers/modérés recommandés comme témoins positifs (TP) pour les essais sur cobayes (LD 406) (13) conviennent également à l'ELGL (6) (8) (15). La présente Ligne directrice décrit également une approche simplifiée de l'ELGL (ELGLs) optionnelle, qui pourrait nécessiter jusqu'à 40 % d'animaux en moins (16) (17) (18). Cet essai simplifié pourrait être utilisé en cas de besoin réglementaire de confirmer les prévisions négatives concernant le pouvoir de sensibilisation cutanée, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente Ligne directrice pour les essais. La prédiction d'un résultat négatif s'appuie sur toutes les informations disponibles, comme cela est décrit au paragraphe 4. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée est préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si, en dépit des prévisions, l'ELGL simplifié donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat. L'ELGLs ne convient pas pour identifier les substances d'essai sensibilisantes pour la peau lorsque des données sur la relation dose-effet sont nécessaires, comme par exemple pour la sous-catégorisation conformément à la classification du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques de l'Organisation des Nations-Unies.

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'annexe 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

© OCDE, (2010).

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

4. L'ELGL constitue une méthode de remplacement pour identifier les substances d'essai susceptibles d'exercer une action sensibilisante sur la peau. Cela n'implique pas que l'ELGL doive systématiquement remplacer les essais sur cobayes (LD 406) (13), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces essais, et dont les résultats positifs ou négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire. Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo*, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL avec la substance d'essai considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances avec l'ELGL (voir paragraphe 5), et aident à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL, mise en œuvre *in vivo*, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Elle est néanmoins susceptible de réduire le nombre d'animaux requis à ces fins. En outre, l'ELGL propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. L'ELGL se fonde sur les réactions immunologiques induites par les produits chimiques pendant la phase d'induction de la sensibilisation. Contrairement aux essais sur cobayes (LD 406) (13), l'ELGL ne s'appuie pas sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (13). C'est pourquoi l'ELGL réduit la souffrance et le stress chez les animaux. Malgré les avantages de l'ELGL par rapport à la LD 406, certaines limites peuvent imposer de privilégier les essais sur cobayes (13) (par exemple, résultats faussement négatifs avec certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (19) (20), ou solubilité de la substance d'essai). De surcroît, certaines substances ou familles de substances comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (21) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (LD 406) (13). Par ailleurs, en examinant la base de données de validation, limitée et essentiellement constituée de formulations de pesticides, on observe que l'ELGL donne plus de résultats positifs que l'essai sur cobayes pour ces types de substances (22). Concernant les formulations, il est cependant envisageable de tester des substances d'essai similaires aux effets connus en tant que substances d'essai étalons, afin de prouver que l'ELGL est efficace (voir paragraphe 16). Dans ces limites, l'ELGL est applicable à toute substance d'essai qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. L'ELGL repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène, et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 3, il est justifié de classer la substance d'essai comme substance ayant un pouvoir de sensibilisation cutanée. Les méthodes décrites ici mesurent la prolifération cellulaire dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage à l'aide d'un marquage radioactif *in vivo*. Il est toutefois possible de faire appel à d'autres paramètres pour évaluer le nombre de cellules en prolifération, à condition de respecter strictement les normes de performance (annexe 1).

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides, de souche CBA/Ca ou CBA/J. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minimale entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (23), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie est maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimentent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances d'essai liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et inter-laboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation de plus de 3 points par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP est choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un $IS > 20$ est considéré comme excessif, par exemple). Les substances utilisées en priorité comme TP sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4/1, v/v), ainsi que le mercaptobenzothiazole (N° CAS 149-30-4) à 5 % dans le *N,N*-diméthylformamide (voir

annexe 1, tableau 1). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, dans certaines circonstances des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) de la substance utilisée comme TP peuvent convenir pour des laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que faire une étude de TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus avec la substance d'essai depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent est réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (12).

15. Quoique la substance utilisée comme témoin positif doive être testée dans un véhicule déclenchant un effet constant (par exemple acétone/huile d'olive (4:1, v/v)), certaines situations réglementaires nécessitent aussi l'essai d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (24). Si le composé utilisé comme TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un essai témoin indépendant pour le véhicule du TP.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances d'essai étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substances d'essai. Les substances d'essai étalons présentent les propriétés suivantes:

- Similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester;
- Caractéristiques physiques et chimiques connues;
- Données connues provenant de l'ELGL;
- Données connues provenant d'autres modèles animaux et/ou de l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe témoin négatif concurrent ne recevant que le véhicule de cette

substance d'essai et un témoin positif (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses du témoin positif, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (3) et (5). Des doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée fait l'objet d'une justification scientifique. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou des substances d'essai analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière à ce que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (3) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Le véhicule ne doit pas perturber ou introduire un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le *N,N*-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (19) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclameront un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veillera tout particulièrement à ce que les substances hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 35). En outre, il est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP en se fondant sur des données individuelles (12). Du reste, certaines autorités réglementaires nationales exigent la collecte de données pour chaque animal. D'autres autorités sont toutefois susceptibles d'accepter des données par groupe d'animaux, auquel cas le choix d'un relevé des résultats par animal ou par groupe est laissé à la discrétion des expérimentateurs.

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris

pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, le sixième jour cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations cutanées locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème 3 et/ou un épaissement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'ELGL principal est la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1: Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaissement de l'oreille de 25 % (26) (27), toute augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins permet aussi d'identifier les produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35)(36) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur ou un stress légers et passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés (37).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

- Premier jour :
Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µl d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille;
- Deuxième et troisième jours:
Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour;
- Quatrième et cinquième jours:

Aucun traitement.

- Sixième jour:

Noter le poids de chaque animal. Injecter 250 µl d'une solution tampon phosphate stérile [phosphate-buffered saline] (PBS) contenant 20 µCi (7.4×10^5 Bq) de (3 H)-méthylthymidine dans la veine caudale de toutes les souris traitées et témoins. Il est également possible d'injecter 250 µL de PBS stérile contenant 2 µCi (7.4×10^4 Bq) de 125 I-iododésoxyuridine et de la fluorodésoxyuridine à 10^{-5} M dans la veine caudale de toutes les souris. Euthanasier les animaux cinq heures (5 h) plus tard. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris, puis placer ceux d'un même individu dans une solution de PBS (approche par animal), ou placer tous les ganglions lymphatiques d'un même groupe de traitement dans la même solution PBS (approche par groupe). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (12). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour l'approche par animal comme pour l'approche par groupe, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire. Les CGL sont lavées deux fois avec un excès de PBS et l'ADN précipite par l'action d'acide trichloracétique à 5 % à 4 °C pendant 18 heures (3). Les granules sont soit remis en suspension dans 1 mL d'acide trichloracétique et transférés dans des flacons à scintillation contenant 10 mL de scintillateur liquide pour le comptage des 3 H, soit transférés directement dans des tubes de comptage gamma pour le comptage de 125 I.

Détermination de la prolifération cellulaire (radioactivité incorporée)

27. L'incorporation de la 3 H-méthylthymidine se mesure par comptage à β -scintillation en désintégrations par minute (DPM). L'incorporation de 125 I-iododésoxyuridine, mesurée par comptage de 125 I, s'exprime également en DPM. En fonction de l'approche adoptée, l'incorporation s'exprimera en DPM/souris (approche par animal) ou en DPM/groupe de traitement (approche par groupe).

ELGL simplifié (ELGLs)

28. Si la réglementation demande de confirmer les prévisions négatives quant au pouvoir de sensibilisation cutanée, il est possible de mettre en œuvre l'ELGLs (16) (17) (18), qui requiert moins d'animaux, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente Ligne directrice. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée doit être préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si l'ELGLs donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat.

29. La seule différence entre les méthodes ELGL et ELGLs est la réduction du nombre de groupes de dose; c'est pourquoi l'ELGLs ne livre pas d'informations sur la relation dose-effet. Par voie de conséquence, l'ELGLs ne saurait être appliqué lorsque des données sont nécessaires en la matière. Tout comme pour la méthode ELGL utilisant plusieurs doses, la concentration maximum de substance d'essai choisie pour l'ELGLs correspond à la concentration maximum n'induisant pas de toxicité systémique manifeste et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris (voir paragraphe 18).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

30. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examinera attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (37).

Poids corporels

31. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

32. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS). Pour l'approche par animal, cet IS s'obtient en divisant la moyenne des DPM/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des DPM/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule. L'indice de stimulation moyen pour les témoins traités avec le véhicule est alors égal à 1. Pour l'approche par groupe, l'IS s'obtient en divisant l'incorporation du produit radiomarqué dans chaque groupe de traitement par l'incorporation observée dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule: on obtient alors un IS moyen.

33. Un résultat est considéré comme positif lorsque l'indice de stimulation est supérieur ou égal à 3. Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite est jugé positif (4) (5) (6).

34. Pour clarifier les résultats, diverses propriétés de la substance d'essai sont prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurale avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (7).

35. Le relevé des données radioactives pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'importance d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple comparaison par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de Williams pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, le chercheur doit être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, l'investigateur peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés « valeurs aberrantes »).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

36. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau. Avec l'approche par animal, indiquer les DPM relevées pour chaque individu, la moyenne des DPM/souris du groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart-type, erreur-type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent. Avec l'approche par groupe, indiquer la moyenne et la médiane des DPM ainsi que la moyenne des IS de chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

37. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance d'essai et substances témoins:

- données d'identification (par exemple numéro CAS, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot);
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité);
- s'il s'agit d'une formulation: composition et pourcentages relatifs des constituants;

Solvant/véhicule:

- données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé);
- justification du choix du véhicule;

Animaux d'essai:

- source des souris CBA;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu;
- nombre et âge des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;

Conditions d'essai:

- détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai;
- justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant);
- concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée;
- détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture, et provenance de l'eau);
- détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage;
- méthodes de détermination de la toxicité;
- critères de décision concernant les études positives ou négatives;
- détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

- résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé;
- résultats du laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent;
- en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

- poids corporel de chaque souris au début du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart-type, erreur-type de la moyenne) pour chaque groupe de dose;
- moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal;
- tableau des DPM et IS pour chaque souris (approche par animal) ou moyenne et médiane des DPM et IS (approche par groupe) pour chaque groupe de traitement;
- moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart-type, erreur-type de la moyenne) des DPM/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux en cas d'approche par animal;
- indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins, en cas d'approche par groupe;
- relation dose-effet;
- analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

- bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2002), *Sensibilisation cutanée : essai des ganglions lymphatiques locaux*, Ligne directrice No. 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante : [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
- (2) Kimber, I. et Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. aNPd Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3): 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3): 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

- (13) OCDE (1992), *Sensibilisation de la peau*, Ligne directrice No. 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
- (14) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Série sur les essais et évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. et Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. et Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Avril 2007. Disponible à l'adresse suivante : [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report, The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante : [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report, Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in

- Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante : [http://iccvam.niehs.nih.gov/]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7^{ème} édition. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OCDE (2002), *Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Ligne directrice No. 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante :
[http://www.oecd.org/document/40/0 3343,en 2649 34377 37051368 1 1 1 1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96 (S-1), 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante : [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by *Pfiesteria* extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

- (35) OCDE (1987), *Toxicité cutanée aiguë*, Ligne directrice No. 402, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices\]](http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices)
- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante : [\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)
- (37) OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices\]](http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices)

ANNEXE 1**NORMES DE PERFORMANCE POUR L'ÉVALUATION DES MÉTHODES D'ELGL
SIMILAIRES OU MODIFIÉES PROPOSÉES POUR LES ESSAIS DE SENSIBILISATION
CUTANÉE****INTRODUCTION**

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées ou non (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement). Conçues à partir de méthodes d'essai validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la précision et la fiabilité de méthodes d'essai analogues (aussi appelées « répliques d'essais ») fondées sur des principes scientifiques similaires et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (14).

2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire des améliorations proposées d'une méthode d'essai approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation est le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (14).

3. La fiabilité et la précision des méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées dans la présente Ligne directrice sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des résultats de l'ELGL. Afin d'éviter toute utilisation injustifiée d'animaux, il est fortement conseillé aux concepteurs de modèles de contacter l'OCDE avant d'entamer les études de validation conformément aux normes de performance et orientations fournies dans la présente Ligne directrice pour les essais.

4. Ces normes de performance, qui sont fondées sur les normes harmonisées émanant du Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12), permettent d'évaluer la validité de versions de l'ELGL similaires ou modifiées. Les normes de performance comprennent les éléments essentiels de la méthode d'essai, les substances de référence recommandées, et les minima requis en termes de précision et de fiabilité.

1. Éléments essentiels de la méthode d'essai

5. Pour s'assurer qu'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée est fonctionnellement et structurellement similaire à l'ELGL et qu'elle mesure le même effet biologique, il convient d'inclure les éléments suivants dans le protocole d'essai:

- La substance d'essai est appliquée localement sur les deux oreilles de la souris;
- La prolifération des lymphocytes est quantifiée dans les ganglions lymphatiques qui drainent le site de l'application de la substance d'essai;
- La prolifération des lymphocytes est mesurée pendant la phase d'induction de la sensibilisation cutanée;

- La dose maximale choisie pour la substance d'essai est la concentration maximale ne provoquant pas de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris. Pour les produits de référence positifs, la dose maximale doit être supérieure ou égale aux CE3 de l'ELGL pour les substances de référence correspondantes (voir tableau 1) sans pour autant induire de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris;
- Chaque étude comprend un véhicule témoin concurrent, et, s'il y a lieu, un témoin positif concurrent;
- Chaque groupe de dose comprend au moins quatre animaux;
- Les données peuvent être collectées par animal ou par groupe d'animaux.

En cas de non-respect d'un de ces critères, les présentes normes de performance ne permettent pas de valider les méthodes d'essai similaires ou modifiées.

II. Liste minimale de substances de référence

6. On trouve dans les normes de performance harmonisées émanant du Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12) un minimum de 18 substances de référence à utiliser, auxquelles s'ajoutent quatre autres substances de référence facultatives. Ces quatre substances donnent des faux positifs ou faux négatifs avec l'ELGL, ce qui n'arrive pas avec les essais sur l'homme ou le cobaye (LD 406) (13), et permet de démontrer une performance supérieure ou égale à celle de l'ELGL. Le choix de ces substances s'appuie sur les critères suivants:

- La liste de substances de référence représente, d'une part, les types de substances dont on teste généralement le pouvoir de sensibilisation cutanée et, d'autre part, l'éventail des effets détectables ou prévisibles par l'ELGL;
- Ces substances présentent des structures chimiques bien définies;
- Des données ELGL provenant d'essais sur cobayes (d'après la LD 406) (13) et (si possible) sur l'homme sont disponibles pour chaque substance; et
- Ces substances sont disponibles dans le commerce.

La liste des substances de référence recommandées est présentée dans le tableau 1. Les études utilisant les substances de référence proposées sont mises en œuvre avec le véhicule correspondant indiqué dans la liste du tableau 1. Si l'une des substances de référence de la liste n'est pas disponible, il est possible de recourir à d'autres substances répondant aux critères de sélection susmentionnés, en justifiant la démarche de manière appropriée.

TABLEAU 1. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE RECOMMANDÉES POUR LES NORMES DE PERFORMANCE ELGL

Numéro	Substance ¹	N° CAS	État	Véh ²	CE3 % ³	N ⁴	0.5 x CE3 - 2.0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
1	5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMI) / 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (MI) ⁵	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0.009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AHO	0.049	15	0.025-0.099	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-phénylènediamine	106-50-3	Sol	AHO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	chlorure de cobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	isoeugénol	97-54-1	Liq	AHO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	Sol	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	Liq	AHO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AHO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	eugénol	97-53-0	Liq	AHO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	benzoate de phényle	93-99-2	Sol	AHO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+
11	alcool cinnamique	104-54-1	Sol	AHO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinylurée	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	méthacrylate de méthyle	80-62-6	Liq	AHO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	chlorobenzène	108-90-7	Liq	AHO	25	1	n.a.	n.a.	-/-	-/*
15	isopropanol	67-63-0	Liq	AHO	50	1	n.a.	n.a.	-/-	-/+
16	acide lactique	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	n.a.	n.a.	-/-	-/*
17	salicylate de méthyle	119-36-8	Liq	AHO	20	9	n.a.	n.a.	-/-	-/-
18	acide salicylique	69-72-7	Sol	AHO	25	1	n.a.	n.a.	-/-	-/-

Numéro	Substance ¹	N° CAS	État	Véh ²	CE3 % ³	N ⁴	0.5 x CE3 - 2.0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
Substances facultatives démontrant une amélioration des performances par rapport à l'ELGL										
19	sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sol	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liq	MEC	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	xylène	1330-20-7	Liq	AHO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	chlorure de nickel	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	n.a.	n.a.	-/+	-/+

Abréviations: AHO = acétone/huile d'olive (4:1, v/v); N° CAS = Numéro attribué par le *Chemical Abstracts Service*; DMF = *N,N*-diméthylformamide; DMSO = diméthylsulfoxyde; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzène; CE3 = concentration estimée nécessaire pour produire un indice de stimulation de 3; cobaye = résultats obtenus sur cobayes (d'après la LD 406) (13); HCA = hexyl cinnamaldéhyde; Liq = liquide; ELGL = résultats sur murins de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (d'après la LD 429) (1); MEC = méthyléthylcétone; n.a. = non applicable puisque l'indice de stimulation est inférieur à 3; NC = non calculée puisque les données proviennent d'une seule étude; Sol = solide; Véh = véhicule d'essai.

¹ Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'on peut les stocker.

² En raison de l'impact éventuel des différents véhicules sur la performance de l'ELGL, il convient d'utiliser le véhicule recommandé pour chaque substance de référence (24)(32).

³ Il s'agit d'une valeur moyenne lorsque plusieurs CE3 sont disponibles. Pour les substances négatives (indice de stimulation < 3), la concentration maximale de l'essai est fournie.

⁴ Nombre d'études ELGL dont découlent les données.

⁵ Disponible dans le commerce sous forme de Kathon CG (N° CAS 55965-84-9), un mélange de CMI et MI à 3:1. Les concentrations relatives de ces composés sont situées entre 1.1 % et 1.25 % pour la CMI, 0.3 % et 0.45 % pour la MI. Les composés inactifs sont des sels de magnésium (21.5 % à 24 %) et le nitrate de cuivre (0.15 % à 0.17 %), le reste de la formulation étant constitué de 74 % à 77 % d'eau. Le Kathon CG est disponible chez Sigma-Aldrich et Rohm and Haas (devenu Dow Chemical Corporation).

* = supposé non sensibilisant chez l'homme, dans la mesure où: on ne repère aucun résultat d'essai clinique épicutané; le produit n'est pas compris dans les kits de test épicutané des allergènes; on ne trouve aucun rapport de cas faisant état d'une sensibilisation chez l'homme.

** = données sur cobayes indisponibles.

III. Normes de fiabilité et de précision

7. La précision d'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée se doit d'égaliser au moins les minima des normes ELGL dans le cadre d'une évaluation effectuée à l'aide des 18 substances de référence minimales à utiliser. La méthode d'essai modifiée ou nouvelle devrait permettre de classer correctement les substances comme étant positives ou négatives. Cependant, elle ne devrait pas forcément permettre de classer comme il convient l'ensemble des 18 substances de référence minimales à utiliser. Si, par exemple, l'un des sensibilisants légers est mal classé, l'essai pourra toutefois être considéré comme présentant des performances équivalentes à condition de fournir les raisons expliquant cette conclusion erronée, ainsi que des données supplémentaires pertinentes (par exemple des résultats corrects obtenus pour d'autres substances dont les propriétés physiques, chimiques et sensibilisantes sont analogues à celles du produit d'essai). Dans ces conditions, la validation d'une telle méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle fera l'objet d'un examen au cas par cas.

Reproductibilité intra-laboratoire

8. La reproductibilité intra-laboratoire d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide d'un sensibilisant bien caractérisé par ELGL. En conséquence, les normes de performance de l'ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats obtenus lors d'essais répétés avec de l'hexyl cinnamaldéhyde (HCA). La reproductibilité intra-laboratoire est évaluée par comparaison des concentrations estimées minimales (CEm) obtenues avec l'HCA lors de quatre essais répétés à intervalles d'une semaine au moins. Cette reproductibilité intra-laboratoire est jugée acceptable lorsqu'un laboratoire parvient à obtenir des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA, ce qui correspond à 0.5 – 2.0 fois la CE3 moyenne spécifiée pour l'HCA (10 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

Reproductibilité inter-laboratoires

9. La reproductibilité inter-laboratoires d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide de deux sensibilisants bien caractérisés par ELGL. Les normes ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats d'essais effectués sur l'HCA et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) dans différents laboratoires. Les CEm respectives découlent d'études individuelles menées dans au moins trois laboratoires séparés. La reproductibilité inter-laboratoires est jugée acceptable lorsque chaque laboratoire obtient des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA et entre 0.025 % et 0.1 pour le DNCB, ce qui correspond à 0.5 – 2.0 fois la CE3 moyenne spécifiée respectivement pour l'HCA (10 %) et le DNCB (0.05 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

ANNEXE 2

DÉFINITIONS

Assurance-qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Concentration estimée minimale (CEm): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire un indice de stimulation indiquant une réponse positive.

Concentration estimée trois (CE3): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire une réponse correspondant à un indice de stimulation égal à trois.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (14).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (14).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (14).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Méthode d'essai protégée: méthode d'essai dont la fabrication et la distribution sont protégées par des brevets, droits d'auteur, marques, etc.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (14).

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai; (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée; et (iii) les niveaux de précision et de fiabilité, similaires à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (14).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (14).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa

pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (14).

Produits chimiques de référence: produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence *in vitro* ou *in vivo* ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels elle est conçue, qu'elles soient fortes, faibles ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (14).

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Une telle méthode d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (14).

Reproductibilité inter-laboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de pré-validation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (14).

Reproductibilité intra-laboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (14).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai: toute substance testée selon la présente Ligne directrice, qu'elle consiste en un composé simple ou comporte plusieurs composants (par exemple, produits finis, formulations). Pour tester les formulations, il faut prendre en compte le fait que certaines autorités réglementaires n'exigent des essais que sur la formulation du produit fini. Il peut toutefois exister d'autres obligations d'essai concernant la ou les matières actives contenues dans une formulation.

Substance d'essai étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon doit posséder les propriétés suivantes : (i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances testées; (iii) posséder des caractéristiques physiques et chimiques connues; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.