

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

### **Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: DA**

#### INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première Ligne directrice (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 en 2002, et a depuis été mise à jour (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). La méthode ELGL s'appuie sur un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application dans les régions où l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: DA (développé par Daicel Chemical Industries, Ltd.) est une variante non radioactive de l'ELGL, qui quantifie l'adénosine triphosphate (ATP) par bioluminescence pour estimer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: DA a été validée, et évaluée et recommandée par un comité international d'examen, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances d'essai ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12) (13). La présente Ligne directrice permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques chez les animaux. La LD 406 fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (14). L'ELGL (LD 429) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: DA (LD 442 A) et ELGL: BrdU-ELISA (LD 442 B), sont toutes plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans la LD 406 (14) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: DA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En revanche, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour détecter les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (LD 406) (14).

#### DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'annexe 1.

#### REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: DA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances d'essai susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans des limites spécifiques. Cela n'implique pas que l'ELGL: DA doive systématiquement remplacer l'ELGL ou les essais sur cobayes (LD 406) (14), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de

© 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.*

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: DA avec la substance d'essai considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances avec l'ELGL: DA (voir paragraphe 5), et aider à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL: DA, mise en œuvre *in vivo*, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (LD 406), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (14). En outre, l'ELGL: DA propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence de la LD 406 (14), l'ELGL: DA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. Malgré les avantages de l'ELGL: DA par rapport à la LD 406, certaines limites peuvent imposer de privilégier les essais sur cobayes (14) (par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1), solubilité de la substance d'essai). De surcroît, certaines substances ou familles de substances d'essai comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (16) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (LD 406) (14). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1) comme étant également valables pour l'ELGL: DA (10). Il se peut en outre que la méthode ELGL: DA ne convienne pas aux substances qui modifient les niveaux d'ATP (c'est-à-dire qui agissent comme inhibiteurs de l'ATP) ou perturbent la quantification précise de l'ATP intracellulaire (par exemple, présence d'enzymes dégradant l'ATP, présence d'ATP extracellulaire dans le ganglion lymphatique). Dans ces limites, l'ELGL: DA est applicable à toute substance d'essai qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1.8 et 2.5 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 44 substances présentant un  $IS \geq 1.8$  (voir paragraphe 6), l'ELGL: DA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour trois des 12 substances non sensibilisantes présentant des indices de stimulation compris entre 1.8 et 2.5 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

6. L'ELGL: DA 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 1.8, on peut ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les méthodes décrites ici s'appuient sur la quantification de l'ATP par bioluminescence (facteur connu pour être en corrélation avec le nombre de cellules vivantes) (17) pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage (18) (19). Cette technique par bioluminescence utilise l'enzyme luciférase pour catalyser la formation de lumière à partir d'ATP et de luciférine selon la réaction suivante :



L'intensité de la lumière émise suit une pente linéaire en fonction de la concentration en ATP, et se mesure à l'aide d'un luminomètre. L'essai luciférine-luciférase constitue une méthode précise pour quantifier l'ATP et trouve de nombreuses applications (20).

## DESCRIPTION DE L'ESSAI

### *Choix des espèces animales*

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: DA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/J, qui sera donc privilégiée pour cet essai (12) (13). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime 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: DA.

### *Conditions d'hébergement et d'alimentation*

8. Les souris sont hébergées par groupes (21), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à 22 °C ± 3 °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'acclimatent 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 d'essai 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 liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances d'essai 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 aux sensibilisants pour lesquels 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: DA. En conséquence, 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: DA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation d'au moins 1.8 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera 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 > 10 sera considéré comme excessif, par exemple). Les substances utilisées en priorité comme TP sont l'hexyl cinnaldéhyde à 25 % (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (N° CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4 : 1, v/v). 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, des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles  $\leq$  6 mois) de la substance utilisée comme TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: DA 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: DA 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: DA 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 tester le 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 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 sera 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 (22).

15. Quoique la substance utilisée comme témoin positif soit testée dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive; 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'utilisation d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (23). 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 TV indépendant pour le TP concurrent.

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 étalons présentent les propriétés suivantes:

- Similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester;
- Caractéristiques physiques et chimiques connues;
- Données obtenues avec l'ELGL: DA;
- Données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou 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 TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un groupe TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, 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 (2) et (24). Les 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 est scientifiquement justifié. 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 ses 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 (24) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas 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 (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament 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 veille 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 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (22). Du reste, certaines autorités réglementaires nationales exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

**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: DA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: DA 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: DA, 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 de l'essai (huitième 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), le septième jour (24 heures avant la fin) et le huitième jour. De plus, au huitième jour cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème  $\geq 3$  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'étude ELGL : DA principale sera 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), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des 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) (31) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: DA 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 et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le huitième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (36).

### *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 une solution aqueuse de sodium lauryl sulfate (SLS) à 1 % au dos de chaque oreille à l'aide d'un pinceau trempé dans la solution de SLS de manière à couvrir l'ensemble de la surface externe en quatre à cinq applications. Une heure après le traitement au SLS, 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, troisième et septième jours:

Répéter le prétraitement avec la solution aqueuse de SLS à 1 % puis l'application de la substance d'essai en suivant la même procédure que le premier jour.

- Quatrième, cinquième et sixième jours:

Aucun traitement.

- Huitième jour:

Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Environ 24 à 30 heures après le début des applications du septième jour, euthanasier les animaux. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (22). 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 chaque souris, on prépare une suspension de cellules isolées provenant des ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement en plaçant ces ganglions entre deux lames de verres sur lesquelles on exerce une légère pression pour écraser les échantillons. Après avoir vérifié que le tissu est bien étalé, séparer les deux lames. Pour disperser le tissu présent sur ces lames dans le PBS, incliner chacune d'elle au-dessus de la boîte de Pétri, puis racler le tissu avec un grattoir à cellules tout en rinçant

avec la solution. Les ganglions lymphatiques des animaux TN étant petits, il convient de les traiter avec soin pour éviter tout artefact sur les valeurs IS. Le volume total de PBS utilisé pour rincer les deux lames est de 1 mL. Homogénéiser doucement la suspension de CGL dans la boîte de Petri à l'aide du grattoir à cellules. Prélever alors une aliquote de 20 µL de suspension homogénéisée à l'aide d'une micropipette en prenant soin de ne pas capter la membrane, visible à l'œil nu, puis mélanger cette aliquote avec 1.98 mL de PBS pour obtenir un échantillon de 2 mL. Un second échantillon de 2 mL est ensuite préparé selon la même procédure de façon à en obtenir deux par animal.

#### ***Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de l'ATP des lymphocytes)***

27. Les augmentations de la teneur en ATP des ganglions lymphatiques sont déterminées par la méthode luciférine/luciférase avec un kit de mesure de l'ATP qui calcule la bioluminescence, exprimée en unités relatives de luminescence [relative luminescence unit] (RLU). Le temps écoulé entre le sacrifice de l'animal et la quantification de l'ATP pour chaque individu demeure uniforme, et ne dépasse pas environ 30 minutes, car la teneur en ATP est supposée diminuer progressivement à partir de l'euthanasie (12). Ainsi, l'ensemble des procédures entre l'excision des ganglions lymphatiques auriculaires et les mesures d'ATP seront réalisées en 20 minutes d'après un programme préétabli valable pour tous les animaux. Il convient de déterminer la luminescence due à l'ATP dans chacun des échantillons de 2 mL, soit deux mesures d'ATP par souris. La moyenne de ces résultats est alors établie et utilisée dans les calculs suivants (voir paragraphe 31).

### **OBSERVATIONS**

#### ***Observations cliniques***

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de détecter 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 (36).

#### ***Poids corporels***

29. 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**

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant la moyenne des RLU/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des RLU/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque  $IS \geq 1.8$  (10). 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 (c'est-à-dire un IS situé entre 1.8 et 2.5) est jugé positif (2) (3) (37).

32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1.8 et 2.5), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité

systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle 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 (4).

33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité 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, comparaisons 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, il faut 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, on 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 RAPPORTS

### *Résultats*

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les RLU pour chaque animal, la moyenne des RLU/animal pour chaque 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.

### *Rapport d'essai*

35. 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:*

- Source, numéro de lot, données fournies par le fabricant sur l'assurance qualité/ le control qualité du kit ATP;
- 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 plus récent test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé;
- Résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule);
- 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;

*Résultat:*

- Poids corporel de chaque souris au lancement 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 au site d'administration, pour chaque animal;
- Heure du sacrifice de l'animal et heure de la mesure d'ATP pour chaque animal;
- Tableau des RLU et IS par souris pour chaque groupe de dose;
- moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart-type, erreur-type de la moyenne) des RLU/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux;
- 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;
- 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) Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) 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.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing 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.
- (6) 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 Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante : [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (7) 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, 258-273.
- (8) 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, 274-286.
- (9) 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, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante : [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for

assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante : [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf)].

- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. et Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. et Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) 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>
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, 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.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, 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.
- (17) Crouch, S.P., Kozłowski, R., Slater, K.J. et Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. et Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. et Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7<sup>ème</sup> édition. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) 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](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

- (24) 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.
- (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/env/lignesdirectrices>
- (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, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive 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. et 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) 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)].
- (36) 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)

- (37) 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 sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J, Toxicol, Environ. Health*, 53 563-79.
- (38) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices\]](http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices)

## ANNEXE 1

## 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.

**Faux négatif** : substance identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (38).

**Faux positif** : substance identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (38).

**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 (38).

**Indice de stimulation (IS)** : paramètre d'évaluation du pouvoir 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.

**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 (38).

**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 prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (38).

**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 (38).

**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 étalon :** substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: (i) source(s) régulières et fiables; (ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester ; (iii) caractéristiques physiques et chimiques connues; (iv) données confirmant les effets connus; et (v) 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.