

II

(Actes non législatifs)

RÈGLEMENTS

RÈGLEMENT (UE) N° 640/2012 DE LA COMMISSION

du 6 juillet 2012

modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique, le règlement (CE) n° 440/2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission⁽¹⁾, et notamment son article 13, paragraphe 3,

considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CE) n° 440/2008 de la Commission⁽²⁾ définit les méthodes d'essai à appliquer pour déterminer les propriétés physico-chimiques ainsi que la toxicité et l'écotoxicité des substances, aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006.

(2) Il est nécessaire de mettre à jour le règlement (CE) n° 440/2008 pour y inclure en priorité les méthodes d'essai nouvelles et actualisées qui ont été adoptées récemment par l'OCDE afin de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales, conformément à

la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques⁽³⁾ et à la directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques⁽⁴⁾. Les parties concernées ont été consultées sur le présent projet.

(3) Il convient donc de modifier le règlement (CE) n° 440/2008 en conséquence.

(4) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité institué par l'article 133 du règlement (CE) n° 1907/2006,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 est modifiée conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

⁽¹⁾ JO L 396 du 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ JO L 142 du 31.5.2008, p. 1.

⁽³⁾ JO L 276 du 20.10.2010, p. 33.

⁽⁴⁾ JO L 358 du 18.12.1986, p. 1.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 6 juillet 2012.

Par la Commission
Le président
José MANUEL BARROSO

ANNEXE

L'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 est modifiée comme suit:

1) Le chapitre B.42 est remplacé par le texte suivant:

«B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices (LD) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne qui sont fondées sur celles-ci 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 méthode d'essai initiale visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL; LD 429 de l'OCDE, chapitre B.42 de la présente annexe), a été adoptée antérieurement (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 méthode d'essai permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. L'autre méthode d'essai (LD 406 de l'OCDE, chapitre B.6 de la présente annexe) 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 au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de bien-être des animaux. Cette mise à jour de la méthode d'essai sur l'ELGL comprend une série de normes de performance (appendice 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 de l'OCDE (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 (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) conviennent également à l'ELGL (6) (8) (15). La présente méthode d'essai 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 méthode d'essai. 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 pour la sous-catégorisation conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, et 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'appendice 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. L'ELGL constitue une méthode de remplacement pour identifier les substances et mélanges chimiques susceptibles d'exercer une action sensibilisante sur la peau. Cela n'implique pas que l'ELGL doive systématiquement remplacer les essais sur cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (14) 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 considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques 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 (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (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 au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE, certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B.6 ou de la LD 406 de l'OCDE (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 chimiques 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 (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (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 similaires aux effets connus en tant que substances étalons, afin de prouver que l'ELGL est efficace (voir paragraphe 16). Dans ces limites, l'ELGL est applicable à toute substance 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 procédures 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 (appendice 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 % 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 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. 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 et mélanges chimiques solides sont dissouts ou dispersés dans des solvants/véhicules puis dilués, s'il y a lieu, avant d'être appliqués sur l'oreille des souris. Les substances et mélanges chimiques liquides peuvent être appliqués purs ou préalablement dilués. Les substances et mélanges chimiques insolubles, comme ceux que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumis 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 interlaboratoires. 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. 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 appendice 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) du 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 le témoin positif doive être testé 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 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 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. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:
 - similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances d'essai 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 11-14). 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 analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière 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 d'essai 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 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 épaississement 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 épaississement 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 ($7,4 \times 10^5$ 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 ($7,4 \times 10^4$ 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 méthode d'essai. 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 maximale de substance d'essai choisie pour l'ELGLs correspond à la concentration maximale 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 radiomarké 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 et numéros CE, 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'un mélange: 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 n° 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., and 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/LLNAPerfStd.pdf]
13. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice n° 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 sensitisation: 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 sensitising 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^e 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 n° 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
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 sensitisation 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 sensitisation by Pfisteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
35. OCDE (1987), Toxicité cutanée aiguë, Ligne directrice n° 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>]
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]
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>]

Appendice 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 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 similaires ou modifiées proposées dans la présente méthode d'essai 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 les autorités appropriées avant d'entamer les études de validation conformément aux normes de performance et orientations fournies dans la présente méthode d'essai.
4. Ces normes de performance, qui sont fondées sur les normes harmonisées émanant du comité de coordination interagences 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 produits chimiques de référence recommandés, et les minima requis en termes de précision et de fiabilité.

I. 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 chimiques de référence positifs, la dose maximale doit être supérieure ou égale aux CE3 de l'ELGL pour les produits chimiques de référence correspondants (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 similaires ou modifiées.

II. Liste minimale de produits chimiques de référence

6. On trouve dans les normes de performance harmonisées émanant du Comité de coordination interagences 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 produits chimiques 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 (chapitre B.6 ou LD 406 de l'OCDE) (13), et permet de démontrer une performance supérieure ou égale à celle de l'ELGL. Le choix de ces produits chimiques s'appuie sur les critères suivants:

- la liste de produits chimiques 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 le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) et (si possible) sur l'homme sont disponibles pour chaque substance, et
- ces substances sont disponibles dans le commerce.

La liste des produits chimiques de référence recommandés est présentée dans le tableau 1. Les études utilisant les produits chimiques de référence proposés sont mises en œuvre avec le véhicule correspondant indiqué sur 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

Produits chimiques de référence recommandés pour les normes de performance ELGL

Numéro	Produit chimique ⁽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	Produit chimique ⁽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 B.6 ou la LD 406 de l'OCDE) (13); HCA = hexyl cinnamaldéhyde; Liq = liquide; ELGL = résultats sur murins de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (d'après B.42 ou la LD 429 de l'OCDE) (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.

(*) 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.

⁽¹⁾ Les produits chimiques sont préparés 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 produit chimique 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).

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 produits chimiques de référence au minimum 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 produits chimiques de référence au minimum 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 chimique de référence). 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 intralaboratoire

8. La reproductibilité intralaboratoire 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 intralaboratoire 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 intralaboratoire 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 interlaboratoires

9. La reproductibilité interlaboratoires 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 interlaboratoires 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).

Appendice 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 intralaboratoire et interlaboratoires (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 interlaboratoires: 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 interlaboratoires 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 (14).

Reproductibilité intralaboratoire: 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 (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance 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 physico-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.»

- 2) Le chapitre B.46 est remplacé par le texte suivant:

«B.46. IRRITATION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

INTRODUCTION

1. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une période allant jusqu'à quatre heures [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations unies (ONU) et le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (1)(3)]. La présente méthode d'essai propose une procédure *in vitro* pouvant servir à identifier les dangers liés aux produits chimiques (substances et mélanges) irritants correspondant à la définition du SGH de l'ONU et à la catégorie 2 du règlement CLP de l'Union européenne (1) (2) (3). Dans l'Union européenne et les autres régions n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative (substances faiblement irritantes) selon le SGH de l'ONU, la présente méthode d'essai peut aussi servir à identifier des produits chimiques non classés, c'est-à-dire ne relevant d'aucune catégorie dans le SGH de l'ONU ou le règlement CLP de l'Union européenne (1) (3). Cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer le pouvoir irritant pour la peau d'un produit chimique, en tant que méthode de substitution à part entière remplaçant l'essai d'irritation cutanée *in vivo*, dans le cadre d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux (4 et chapitre B.4 de la présente annexe).

2. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [LD 404 de l'OCDE, chapitre B.4 de la présente annexe] (4). Par souci du bien-être animal, le chapitre B.4 a été révisé en 2004 afin que la corrosion/irritation cutanée puisse être déterminée via une stratégie d'essai à plusieurs niveaux, faisant appel à des méthodes d'essai in vitro ou ex vivo validées, de manière à éviter d'infliger des souffrances aux animaux. Trois méthodes d'essai in vitro validées ont été adoptées: elles constituent respectivement les lignes directrices 430, 431 et 435 de l'OCDE (5) (6) (7) et deux d'entre elles les chapitres B.40 et B.40 bis de la présente annexe, qui sont destinées au volet "corrosivité" de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le chapitre B.4 de la présente annexe ou la LD 404 de l'OCDE (4).
3. La présente méthode d'essai porte sur le danger d'irritation cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un épiderme humain reconstitué qui, par sa conception globale (utilisation de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain en tant que source cellulaire, ainsi que de tissus et architectures cellulaires représentatifs), reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. La présente méthode d'essai comprend également un ensemble de normes de performance (appendice 2) pour l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées, développées par le ECVAM-EC (8), conformément aux principes du document d'orientation n° 34 de l'OCDE (9).
4. Il existe trois méthodes validées conformes à la présente méthode d'essai. Des études de prévalidation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour une méthode in vitro (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué, disponible dans le commerce sous le nom d'EpiSkin™ (et désignée comme la méthode de référence validée, ou MRV). Deux autres méthodes d'irritation cutanée in vitro sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné des résultats analogues à ceux de la MRV selon une validation fondée sur les normes de performance (21): il s'agit des méthodes EpiDerm™ SIT (EPI-200) et SkinEthic™ RHE (22).
5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode in vitro sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée, autre que la MRV, EpiDerm™ SIT (EPI-200) ou SkinEthic™, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, de manière à s'assurer que ses caractéristiques sont comparables à celles de la MRV, conformément aux normes de performance figurant dans la présente méthode d'essai (appendice 2). En outre, il est recommandé de consulter le document explicatif accompagnant le projet de ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée in vitro avant de développer et de valider une méthode in vitro sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée et de la soumettre en vue d'une adoption réglementaire (23).

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. L'une des limites de la présente méthode d'essai, comme l'a démontré l'étude de validation (16), est qu'elle ne permet pas la classification des produits chimiques dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (1). Lorsqu'elle est utilisée en tant que méthode d'essai partiellement substitutive, un essai ultérieur in vivo peut être nécessaire pour compléter la caractérisation du potentiel d'irritation cutanée (4 et chapitre B.4 de la présente annexe). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.
8. La présente méthode d'essai se rapporte au volet "irritation cutanée in vitro" de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le chapitre B.4 (LD 404 de l'OCDE) pour les essais d'irritation/corrosion cutanée (4). Si elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée, on notera cependant que le chapitre B.40 bis (LD 431 de l'OCDE) relatif à la corrosion cutanée, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (chapitre B.40 bis). La présente méthode a recours à des modèles d'épiderme humain reconstitué utilisant des kératinocytes humains, et reproduisant donc in vitro l'organe cible de l'espèce étudiée. De plus, elle couvre directement l'étape initiale de la cascade inflammatoire/du mécanisme d'action (lésions cellulaires et tissulaires causant un traumatisme localisé) survenant au cours de l'irritation in vivo. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données empiriques de cette étude totalisait 58 produits chimiques (16) (18) (23). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des semi-solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation (24). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type. Il convient aussi de noter que les produits chimiques fortement colorés peuvent interférer avec les mesures de la viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger ces interférences (voir les paragraphes 24-26).
9. Une seule expérience réalisée à l'aide de trois répliquats de tissus identiques devrait suffire pour tester les substances dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents répliquats et/ou une viabilité moyenne égale à $50 \pm 5\%$, une seconde expérience est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La substance d'essai est appliquée localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un *stratum corneum* multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe in vivo.

11. L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du *stratum corneum* et la lésion des couches sous-jacentes de kératinocytes. En mourant, les kératinocytes rejettent des médiateurs à l'origine de la cascade inflammatoire qui agit sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des érythèmes et des œdèmes observés (24). Les méthodes fondées sur l'utilisation d'épiderme humain reconstitué permettent de mesurer les événements déclencheurs de la cascade.
12. La viabilité cellulaire des modèles d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (25). Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé ($\leq 50\%$, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne). En fonction du cadre législatif dans lequel les résultats de la présente méthode d'essai sont utilisés, les produits chimiques produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants ($> 50\%$, sans catégorie).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'une des trois méthodes validées conformes à la présente méthode d'essai, les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en utilisant les 10 produits chimiques de référence énumérés au tableau 1. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode similaire développée conformément à cette méthode d'essai, ou une variante d'une des trois méthodes validées, il convient de répondre aux normes de performance décrites à l'appendice 2 de la présente méthode d'essai.
14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

Tableau 1

Produits chimiques de référence ⁽¹⁾

Produit chimique	Numéro CAS	Score in vivo ⁽²⁾	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU/ règlement CLP de l'Union européenne
acide naphtylacétique	86-87-3	0	solide	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	0,3	liquide	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	1	solide	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	1,7	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
3-p-cuményle-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2,3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	liquide	catégorie 2
hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 5 %)	1310-58-3	3	liquide	catégorie 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	3,3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3,4	liquide	catégorie 2

⁽¹⁾ Ces produits chimiques de référence constituent un sous-ensemble des produits chimiques de référence utilisés dans l'étude de validation.

⁽²⁾ Score in vivo d'après B.4 et la ligne directrice 404 de l'OCDE (4).

⁽³⁾ Dans cette méthode d'essai, les substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (matières faiblement irritantes) (1) sont considérées comme "sans catégorie".

⁽⁴⁾ La catégorie 3 (facultative) du SGH de l'ONU n'est pas applicable dans le cadre du règlement CLP de l'Union européenne.

PROTOCOLE

15. Les éléments et le protocole d'une méthode d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après. Un modèle d'épiderme humain est reconstitué; le laboratoire peut le préparer lui-même ou l'obtenir dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour les méthodes EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) et SkinEthicTM RHE (26) (27) (28). Les essais se déroulent dans les conditions suivantes:

Éléments de la méthode d'essai sur épiderme humain reconstitué

Conditions générales

16. L'épithélium est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) doivent être présentes sous un *stratum corneum* fonctionnel. Le *stratum corneum* doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière est démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE₅₀) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée. Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le *stratum corneum* pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

17. La viabilité est mesurée au moyen du colorant MTT (25). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). La densité optique (DO) du solvant d'extraction seul est suffisamment faible, c'est-à-dire < 0,1. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai d'irritation cutanée) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les trois méthodes validées sont indiquées dans le tableau 2. Il est démontré que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2

Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin TM (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm TM SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic TM RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Fonction de barrière

18. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances marqueurs cytotoxiques telles que le SDS ou le Triton X-100. Cette capacité est évaluée par la CI₅₀ et le TE₅₀ (tableau 3).

Morphologie

19. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche).

Reproductibilité

20. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs est démontrée.

Contrôle de qualité

21. Il incombe au développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué de garantir et de démontrer que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 17), à la fonction de barrière (paragraphe 18) et à la morphologie (paragraphe 19). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain (ou l'investigateur en cas d'utilisation d'un modèle "maison"). Seuls les résultats obtenus à l'aide de tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants des substances testées. À titre d'exemple, les plages d'acceptabilité pour les trois méthodes validées sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3

Exemples de critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin TM (SM) (18 heures de traitement par SDS) (26)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm TM SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	$ET_{50} = 4,8 \text{ h}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ hr}$
SkinEthic TM RHE (1 % Triton X-100) (28)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hr}$	$ET_{50} = 9,0 \text{ h}$

Application des substances et mélanges chimiques d'essai et des substances et mélanges chimiques témoins

22. Il convient d'utiliser au minimum trois réplicats par essai pour chaque substance d'essai et pour les témoins. Pour les substances liquides comme pour les substances solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de substance et mélange chimiques d'essai pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum $25 \mu\text{L/cm}^2$ ou 25 mg/cm^2 . Dans le cas de substances ou mélanges solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact entre la substance et mélange chimique d'essai et la surface de l'épiderme. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. À la fin de la période d'exposition, la surface de l'épiderme est nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0,9 %, afin d'éliminer la substance d'essai. En fonction de la méthode validée utilisée, la période d'exposition peut varier entre 15 et 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37 °C. Les durées et températures d'exposition sont optimisées pour chacune des méthodes sur épiderme humain reconstitué, et tiennent compte des propriétés intrinsèques de chaque méthode. Pour de plus amples informations, voir les modes opératoires normalisés des trois méthodes (26) (27) (28).
23. Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) sont utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (dans le cas du TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. Pour les TN, il est recommandé d'utiliser de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline (PBS)].

Mesures de la viabilité cellulaire

24. L'aspect le plus important du protocole est que les mesures de la viabilité ne sont pas réalisées immédiatement après l'exposition aux substances d'essai, mais après une période d'incubation posttraitement suffisamment longue des tissus rincés dans un milieu frais. Cette période permet aussi bien la disparition des effets faiblement cytotoxiques que l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Durant la phase d'optimisation de l'essai (11) (12) (13) (14) (15), une période d'incubation posttraitement de 42 heures s'est révélée optimale.
25. Le test du MTT est une méthode quantitative validée, recommandée pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple 0,3-1 mg/mL) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (ex.: isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de $\pm 30 \text{ nm}$ au maximum.
26. Les propriétés optiques de la substance d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité (la substance d'essai pouvant aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer). Cela peut se produire lorsque la substance d'essai n'a pas été totalement éliminée du tissu par rinçage ou lorsqu'elle a pénétré dans l'épiderme. Si une substance d'essai agit directement sur le MTT (agent réducteur du MTT), est naturellement colorée, ou si elle se colore durant le traitement du tissu, des contrôles supplémentaires sont pratiqués pour détecter et corriger les interférences de la substance d'essai avec la mesure de la viabilité. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des trois méthodes validées (26) (27) (28).

Critères d'acceptabilité

27. Pour chaque méthode faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 21), les tissus traités par le témoin négatif (TN) présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception ainsi qu'à l'intégralité du protocole. Les valeurs de DO des témoins ne sont pas inférieures aux limites historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, rendent compte de leur capacité à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (26) (27) (28). Il y a lieu de définir les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les réplicats de tissu (par exemple, si des écarts types sont utilisés, ils se situent dans l'intervalle unilatéral de tolérance à 95 % calculé à partir des données historiques; pour la MRV, l'écart type est ≤ 18 %).

Interprétation des résultats et modèle prédictif

28. La valeur de DO obtenue pour chaque substance d'essai peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les substances d'essai irritantes et les substances d'essai non classées, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les substances irritantes, sont clairement définies et étayées par des données. Il conviendra par ailleurs de démontrer leur pertinence. Les valeurs seuils permettant de prédire les effets irritants sont indiquées ci-dessous:

- La substance d'essai est considérée comme irritante pour la peau conformément à la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne, si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieure ou égale ($\leq$) à 50 %.
- Selon le cadre législatif dans lequel les résultats de la présente méthode d'essai sont utilisés, la substance chimique d'essai peut être considérée comme non irritante pour la peau conformément à l'absence de catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne, si la viabilité du tissu après exposition et incubation posttraitement est supérieure ($>$) à 50 %.

RÉSULTATS ET RAPPORT*Résultats*

29. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque substance d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en reproduisant les expériences. Il conviendra en outre de préciser les valeurs moyennes $\pm$ écart type correspondant à chaque essai. Les interactions observées avec le réactif MTT et les substances d'essai colorées seront signalées pour chaque substance testée.

Rapport d'essai

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

Produits chimiques d'essai et témoin:

- nom(s) chimique(s), tels que le nom CAS, le numéro CAS, le nom et le numéro CE, s'ils sont connus,
- pureté et composition du produit chimique (en pourcentage en poids),
- propriétés physico-chimiques importantes pour l'exécution de l'essai (par exemple, état physique, stabilité, volatilité, pH et hydrosolubilité, s'ils sont connus),
- le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre),
- conditions de stockage.

*Justification du choix du modèle d'épiderme humain reconstitué et du protocole utilisé**Conditions de l'essai:*

- système cellulaire utilisé,
- informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):
 - i) viabilité,
 - ii) fonction de barrière,
 - iii) morphologie,
 - iv) reproductibilité et valeur prédictive,
 - v) contrôles de qualité (CQ) du modèle,
- détails du protocole utilisé,
- doses d'essai utilisées, durée de l'exposition et de la période d'incubation posttraitement,
- description de toute modification éventuelle du protocole,

- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative):
 - i) acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots,
 - ii) acceptabilité des valeurs des témoins positifs et négatifs par rapport aux moyennes et aux fourchettes des témoins positifs et négatifs,
- description des critères d'évaluation utilisés, notamment justification du choix des valeurs-seuils pour le modèle prédictif,
- référence aux données témoins historiques.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque produit chimique d'essai pour chaque essai et chaque mesure de réplicat,
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou pour les produits chimiques d'essai colorants,
- description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

1. Nations unies (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, ONU New York et Genève, 2007, disponible à l'adresse suivante: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html].
2. EC-ECVAM (2009), Statement on the "Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards", publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC30), 9 avril 2009, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
3. Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.
4. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice n° 404, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
5. OCDE (2004), Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (TER), Ligne directrice n° 430, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
6. OCDE (2004), Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine, Ligne directrice n° 431, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
7. OCDE (2006), Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée, Lignes directrices n° 435, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
8. EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE), disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
9. 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 en anglais à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
10. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. et Botham, P. (2001), A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.
11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. et Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765-770.
12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. et Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107-114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. et Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA* 33, 351-367.

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. et Rubinstein, G. (2005), The in vitro acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. et Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
17. Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α , disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
18. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. et Leclaire, J. (2007), In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.
20. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of in-vitro tests for skin irritation, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC26), 27 avril 2007, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing, Voir la rubrique "Validation Study Documents, section Skin Irritation", à l'adresse: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
22. EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC29), 5 novembre 2008, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
23. OCDE (2010), Document explicatif accompagnant le projet de Ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée in vitro. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 137, OCDE, Paris. [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
24. Welss, T., Basketter, D. A. et Schröder, K. R. (2004), In vitro skin irritation: fact and future, State of the art review of mechanisms and models. Toxicol. in Vitro 18, 231-243.
25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.
26. EpiSkinTM SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkinTM test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals, disponible à l'adresse: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
27. EpiDermTM SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: In vitro EpiDermTM skin irritation test (EPI-200-SIT). For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200), disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
28. SkinEthicTM RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation, disponible à l'adresse suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
29. Harvell, J. D., Lamminstusta, K., et Maibach, H. I. (1995), Irritant contact dermatitis. In: Practical Contact Dermatitis, p. 7-18, (Ed. Guin J. D.), Mc Graw-Hill, New York.
30. Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, JO L 225 du 21.8.2001, p. 1.
31. Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. et Robinson, M. K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test, Contact Dermatitis 51, 1-4.

32. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. et Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data, ALTEX, 14, 359-365.
33. Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. et Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

Appendice 1

Définitions

CI₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE₅₀.

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est utilisé indifféremment à la place de "précision", et se définit comme la proportion de toutes les substances chimiques testées qui ont été correctement classées comme positives ou négatives (9).

Dose infinie: quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et substances chimiques d'essai possibles (9).

Fiabilité: mesure dans laquelle 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 intralaboratoire et interlaboratoires (9).

Irritation cutanée: apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale, non immunogène, qui se manifeste peu après une stimulation (29). Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

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 comparables 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 (9).

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 (9).

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 (9).

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 la méthode d'essai 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 (9).

Règlement CLP de l'Union européenne (règlement de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges): vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges) (3).

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Ce type d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (9).

Sensibilité: proportion des substances d'essai positives/actives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: proportion des substances d'essai négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Stratégie d'essai à plusieurs niveaux: essai faisant appel à plusieurs méthodes de manière séquentielle; les méthodes d'essai sélectionnées à chaque niveau sont déterminées par les résultats du niveau d'essai précédent (9).

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

TE₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI₅₀.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

Appendice 2

Normes de performance pour l'évaluation de méthodes similaires ou modifiées proposées pour les essais d'irritation cutanée in vitro sur épiderme humain reconstitué

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 (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement) ou non. Conçues à partir de méthodes validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la fiabilité et la précision d'autres méthodes analogues (aussi appelées "essais répliques"), fondées sur des principes scientifiques et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (9).
2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire les améliorations proposées d'une méthode 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 sera 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 (9).
3. La fiabilité et la précision des méthodes d'essai similaires (répliques) ou des variantes de l'une des trois méthodes validées [EpiSkinTM (méthode de référence validée, MRV), EpiDermTM SIT (EPI-200) et SkinEthicTM RHE] proposées dans la présente méthode d'essai sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des scores d'irritation de Draize. Les valeurs de fiabilité et de précision obtenues, lors de l'évaluation des méthodes similaires ou modifiées proposées, à l'aide des 20 produits chimiques de référence recommandés dans les normes de performance (tableau 1) sont comparables à celles obtenues par la MRV ou meilleures que celles-ci (tableau 2) (2) (16). Les valeurs de fiabilité et de précision à atteindre sont indiquées aux paragraphes 8 à 12 du présent appendice. Des substances non classées ("sans catégorie" dans le SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne) et classées (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne) (1) représentant différentes classes chimiques sont incluses afin que la fiabilité et la précision (sensibilité, spécificité et précision globale) de la méthode d'essai proposée puissent être comparées à celles de la MRV. Avant d'appliquer une méthode pour tester de nouveaux produits chimiques, il convient de déterminer sa fiabilité et son aptitude à détecter correctement les substances chimiques irritantes de la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne ainsi que, selon le cadre réglementaire pour lequel les données sont produites, son aptitude à détecter correctement les substances chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH.

4. Ces normes de performance sont fondées sur celles du ECVAM (8), mises à jour conformément aux systèmes SGH de l'ONU et CLP de l'Union européenne sur la classification et l'étiquetage (1) (3). Les normes de performance d'origine ont été définies à l'issue de l'étude de validation (21) et établies sur la base du système de classification de l'Union européenne tel que figurant dans la directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (1). À la suite de l'adoption par l'Union européenne du système SGH de l'ONU pour la classification et l'étiquetage des substances chimiques (CLP de l'Union européenne) (3), intervenue entre la finalisation de l'étude de validation et l'achèvement de la présente méthode d'essai, les normes de performance ont été mises à jour (8). Les modifications portent principalement sur: i) l'ensemble de produits chimiques de référence utilisé dans les normes de performance; et ii) les valeurs définies pour la fiabilité et la précision (2) (23).

NORMES DE PERFORMANCE POUR LES MÉTHODES D'ESSAI D'IRRITATION CUTANÉE IN VITRO SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

5. Les normes de performance se composent des trois éléments suivants (9):

- I) les éléments essentiels de la méthode d'essai
- II) une liste minimale de produits chimiques de référence
- III) des valeurs définies de fiabilité et de précision

I) Éléments essentiels de la méthode d'essai

6. Il s'agit des éléments structurels, fonctionnels et procéduraux essentiels d'une méthode d'essai validée qui figurent dans le protocole de toute méthode structurellement et fonctionnellement similaire ou modifiée proposée. Ces éléments recouvrent les caractéristiques propres de la méthode, la description des points clés de la procédure et les mesures de contrôle de qualité. Le respect de ces éléments essentiels contribuera à garantir que les méthodes similaires ou modifiées proposées sont fondées sur les mêmes concepts que la MRV correspondante (9). Les éléments essentiels de la méthode d'essai sont décrits en détail aux paragraphes 16 à 21 de la présente méthode d'essai, et l'essai est réalisé de la manière suivante:

- conditions générales (paragraphe 16),
- conditions fonctionnelles, comprenant:
 - viabilité (paragraphe 17),
 - fonction de barrière (paragraphe 18),
 - morphologie (paragraphe 19),
 - reproductibilité (paragraphe 20),
 - contrôle de qualité (paragraphe 21).

II) Liste minimale de produits chimiques de référence

7. Les produits chimiques de référence sont utilisés pour déterminer si la fiabilité et la précision d'une méthode proposée similaire ou modifiée, dont on a démontré qu'elle était suffisamment similaire à la MRV sur les plans structurel et fonctionnel ou qu'elle représentait une modification mineure par rapport à l'une des trois méthodes validées, sont comparables à celles de la MRV ou meilleures que celles-ci (2) (8) (16) (23). Les 20 produits chimiques de référence recommandés figurant dans le tableau 1 comprennent des substances représentant différentes classes chimiques (catégories chimiques basées sur des groupes fonctionnels) et représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances fortement irritantes). Le tableau comprend dix substances classées dans la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et 10 substances non classées, parmi lesquelles trois relèvent de la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU. Aux fins de la présente méthode d'essai, la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU équivaut à "sans catégorie". Les produits chimiques figurant dans le tableau 1 sont sélectionnés parmi ceux qui sont utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de prévalidation et de validation de la MRV, eu égard à leur fonction chimique et leur état physique (14) (18). Ces produits chimiques de référence représentent le nombre minimal de substances à utiliser pour évaluer la précision et la fiabilité d'une méthode proposée similaire ou modifiée, mais ne sont pas utilisés pour le développement de nouvelles méthodes. Si une substance du tableau n'est pas disponible, il est possible d'utiliser d'autres produits chimiques pour lesquels il existe des données de référence in vivo appropriées, choisis en premier lieu parmi ceux utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de prévalidation ou de validation de la MRV. Si nécessaire, il est possible d'ajouter à cette liste minimale d'autres produits chimiques représentant d'autres classes chimiques et pour lesquels on dispose de données de référence in vivo appropriées, afin d'évaluer plus avant la précision de la méthode proposée.

(1) JO L 225 du 21.8.2001, p. 1.

Tableau 1

Liste minimale de produits chimiques de référence pour la détermination des valeurs de précision et de fiabilité de méthodes d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées ⁽¹⁾

Produit chimique	Numéro CAS	État physique	Score in vivo	Cat. MRV in vitro	Cat. SGH/règlement CLP de l'Union européenne in vivo
1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	liquide	0	cat. 2	sans catégorie
phtalate de diéthyle	84-66-2	liquide	0	sans catégorie	sans catégorie
acide naphtylacétique	86-87-3	solide	0	sans catégorie	sans catégorie
phénoxyacétate d'allyle	7493-74-5	liquide	0,3	sans catégorie	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	liquide	0,3	sans catégorie	sans catégorie
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	liquide	1	cat. 2	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	solide	1	sans catégorie	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	liquide	1,7	sans catégorie	sans catégorie
salicylate d'hexyle	6259-76-3	liquide	2	sans catégorie	sans catégorie
cinnamaldéhyde	104-55-2	liquide	2	cat. 2	sans catégorie (cat. 3 facultative) ⁽³⁾
décane-1-ol ⁽²⁾	112-30-1	liquide	2,3	cat. 2	cat. 2
3-p-cuményle-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	liquide	2,3	cat. 2	cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	liquide	2,7	cat. 2	cat. 2
hydrochlorure de 2-chlorométhyle-4-méthoxy-3,5 diméthyle pyridine	86604-75-3	solide	2,7	cat. 2	cat. 2
Disulfure de dipropyle ⁽²⁾	629-19-6	liquide	3	sans catégorie	cat. 2
hydroxyde de potassium (sol. aqueuse à 5 %)	1310-58-3	liquide	3	cat. 2	cat. 2
Méthyle-2 tert-butyle-5 thiophénol; thio PTBT	7340-90-1	liquide	3,3	cat. 2	cat. 2
1-méthyle-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	solide	3,3	cat. 2	cat. 2
heptanal	111-71-7	liquide	3,4	cat. 2	cat. 2
tétrachloréthylène	127-18-4	liquide	4	cat. 2	cat. 2

⁽¹⁾ La sélection des produits chimiques se fonde sur les critères suivants: i) les substances sont disponibles dans le commerce; ii) elles sont représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances très irritantes); iii) elles ont une structure chimique bien définie; iv) elles sont représentatives de la fonctionnalité chimique utilisée pour la validation; v) elles ne sont pas associées à un profil extrêmement toxique (cancérogène ou toxique pour la reproduction, par exemple) ni à des coûts d'élimination prohibitifs.

⁽²⁾ Substances irritantes chez le lapin, mais pour lesquelles il existe des preuves fiables de leur caractère non irritant chez l'homme ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾ ⁽³³⁾.

⁽³⁾ Dans le cadre du SGH de l'ONU, pas dans le cadre du règlement CLP de l'Union européenne.

III) Valeurs définies de fiabilité et de précision

8. Afin d'établir la fiabilité et la précision de méthodes similaires ou modifiées proposées destinées à des transferts entre laboratoires, les 20 produits chimiques de référence du tableau 1 sont testés dans au moins trois laboratoires différents. Cependant, si la méthode est destinée à être utilisée dans un seul laboratoire, un essai interlaboratoires n'est pas indispensable à la validation. Il est toutefois essentiel que ces études de validation soient évaluées de manière indépendante par des organismes de validation reconnus au niveau international, conformément aux lignes directrices internationales en la matière (9). Dans chaque laboratoire, les 20 produits chimiques de référence font tous l'objet de trois essais indépendants les uns des autres, réalisés sur des lots de tissus différents et à des intervalles de temps suffisamment espacés. Chaque essai comporte au moins trois réplicats de tissus testés simultanément pour chaque produit chimique d'essai, TN et TP.
9. Le calcul des valeurs de la fiabilité et de la précision de la méthode proposée est effectué en tenant compte des quatre critères ci-dessous, afin de garantir qu'il est réalisé de manière prédéfinie et cohérente:
 1. Seules les données issues de séquences d'essais complètes peuvent être utilisées pour le calcul de la variabilité intralaboratoire ou interlaboratoires de la méthode et de la valeur prédictive (précision).
 2. La classification finale de chaque produit chimique de référence dans chaque laboratoire participant est obtenue en utilisant la valeur moyenne de la viabilité constatée lors des différents essais réalisés dans le cadre d'une séquence d'essais complète.
 3. Seules les données obtenues pour des produits chimiques dont les séquences d'essai ont été complétées dans tous les laboratoires participants sont retenues pour le calcul de la variabilité interlaboratoires de la méthode.
 4. Le calcul des valeurs de précision est réalisé en utilisant les prévisions individuelles des laboratoires obtenues pour les 20 produits chimiques de référence par les différents laboratoires participants.

Dans ce contexte, une **séquence d'essais** consiste en trois essais réalisés de manière indépendante dans un laboratoire pour un produit chimique d'essai donné. Une **séquence d'essais complète** est une séquence d'essais réalisée dans un laboratoire pour un produit chimique d'essai, et pour laquelle les trois essais sont recevables. Cela signifie que tout essai non recevable annule la séquence entière des trois essais.

Reproductibilité intralaboratoire

10. L'évaluation de la répétabilité intralaboratoire doit faire apparaître une concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et "sans catégorie") obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par un même laboratoire qui soit supérieure ou égale ($\geq$) à 90 %.

Reproductibilité interlaboratoire

11. Il n'est pas indispensable d'évaluer la reproductibilité interlaboratoire si la méthode proposée n'est utilisée que dans un seul laboratoire. En ce qui concerne les méthodes destinées à être transférées d'un laboratoire à l'autre, la concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et "sans catégorie") obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par au moins trois laboratoires (de préférence), est supérieure ou égale ($\geq$) à 80 %.

Valeur prédictive (précision)

12. La précision (sensibilité, spécificité et précision globale) de la méthode similaire ou modifiée proposée est comparable ou supérieure à celle de la MRV, en tenant compte des informations supplémentaires relatives à sa pertinence pour les espèces étudiées (tableau 2). La sensibilité est supérieure ou égale ($\geq$) à 80 % (2) (8) (23). Toutefois, une restriction spécifique supplémentaire s'applique à la sensibilité de la méthode in vitro proposée, à savoir que seules deux substances in vivo de catégorie 2, le décane-1-ol et le disulfure de dipropyle, peuvent être classées de manière erronée comme "sans catégorie" par plus d'un laboratoire participant. La spécificité de la méthode in vitro proposée est supérieure ou égale ($\geq$) à 70 % (2) (8) (23). Il n'existe aucune restriction supplémentaire concernant la spécificité de la méthode d'essai in vitro proposée, c'est-à-dire que tout laboratoire participant peut classer de manière erronée comme "sans catégorie" une substance in vivo, pourvu que la spécificité finale de la méthode d'essai reste dans la fourchette acceptable. La précision globale est supérieure ou égale ($\geq$) à 75 % (2) (8) (23). Bien que la sensibilité de la MRV calculée pour les 20 produits chimiques de référence figurant dans le tableau 1 soit égale à 90 %, la valeur de sensibilité minimum nécessaire pour qu'une méthode similaire ou modifiée soit considérée comme valable est fixée à 80 %, étant donné que le décane-1-ol (substance à la limite entre deux catégories) et le disulfure de dipropyle (un faux négatif de la MRV) sont connus pour être des produits non irritants chez l'homme (31) (32) (33), même s'ils ont été identifiés comme irritants lors de l'essai chez le lapin. Les modèles d'épiderme humain reconstitué étant construits à l'aide de cellules d'origine humaine, ils prédiront sans doute l'absence d'effets irritants de ces substances ("sans catégorie" dans le SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne).

Tableau 2

Valeurs prédictives requises pour la sensibilité, la spécificité et la précision globale pour qu'une méthode similaire ou modifiée soit considérée comme valable

Sensibilité	Spécificité	Précision globale
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Critères d'acceptation de l'étude

13. Il est possible qu'un ou plusieurs essai(s) relatif(s) à une ou plusieurs substance(s) d'essai ne remplisse(nt) pas les critères d'acceptation pour les substances d'essai et témoins, ou qu'il(s) ne soi(en)t pas acceptable(s) pour d'autres raisons. Afin de compléter les données manquantes, deux essais supplémentaires au maximum pour chaque substance d'essai sont autorisés (nouvel essai). Plus précisément, étant donné qu'en cas de nouvel essai, les TP et TN sont également testés simultanément, deux essais supplémentaires au maximum peuvent être réalisés pour chaque substance d'essai.
14. Il est possible que, même après un nouvel essai, le nombre minimum de trois essais valables nécessaire pour chaque substance testée ne soit pas atteint pour tous les produits chimiques de référence dans tous les laboratoires participants, et que par conséquent la matrice de données obtenue soit incomplète. Dans ce cas, il convient de respecter les trois critères suivants afin de pouvoir considérer les jeux de données comme acceptables:
 - 1) les 20 produits chimiques de référence font l'objet d'au moins une séquence d'essais complète;
 - 2) dans au moins trois laboratoires participants, au minimum 85 % des séquences d'essais sont complètes (pour 20 produits chimiques, cela signifie trois séquences d'essais non recevables autorisées dans un seul laboratoire);
 - 3) au minimum 90 % de toutes les séquences d'essais possibles issues d'au moins trois laboratoires sont complètes (pour 20 produits chimiques testés dans trois laboratoires, cela signifie six séquences d'essais non recevables autorisées au total).»
- 3) Les chapitres suivants sont ajoutés

«B.49. ESSAI IN VITRO DE MICRONOYAUX SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

1. L'essai in vitro de micronoyaux (MNvit) est un essai de génotoxicité consistant à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. L'essai permet de détecter l'activité de substances chimiques clastogènes et aneugènes (substances et mélanges) (1) (2) dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition à la substance d'essai. La présente méthode d'essai autorise l'utilisation de protocoles incluant ou non la cytochalasine B (cytoB), un inhibiteur de polymérisation de l'actine. Une adjonction de cytoB avant la mitose ciblée permet la détermination et l'analyse sélective de la fréquence des micronoyaux dans les cellules ayant effectué une mitose, ces cellules étant binucléées (3) (4). Cette méthode d'essai autorise également l'utilisation de protocoles ne mettant pas en jeu le blocage de la cytokinèse, à condition de pouvoir démontrer que la population cellulaire analysée a bien effectué une mitose.
2. Outre qu'il permet d'identifier des substances chimiques (substances et mélanges) induisant la formation de micronoyaux, l'essai MNvit, associé au blocage de la cytokinèse, au marquage immunochimique des kinétochores ou à l'hybridation avec sondes centromériques/téломériques [hybridation fluorescente in situ (FISH)], peut apporter des informations sur les mécanismes à l'origine des lésions chromosomiques et de la formation de micronoyaux (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Ces procédures de marquage et d'hybridation peuvent être suivies lorsqu'une augmentation de la formation de micronoyaux est constatée et que l'investigateur souhaite déterminer si cette augmentation est le résultat d'événements clastogènes et/ou aneugènes.
3. Contrairement aux aberrations chromosomiques observées dans les cellules en métaphase, qui ne sont pas forcément transmises, les micronoyaux sont des lésions transmises aux cellules-filles. Dans la mesure où les micronoyaux présents dans les cellules en interphase peuvent être évalués de façon relativement objective, le personnel du laboratoire a seulement besoin de déterminer si les cellules ont effectué une mitose, et de dénombrer les cellules contenant un micronoyau. L'examen des préparations est donc relativement rapide, et l'analyse peut être automatisée. Chaque traitement permettant l'examen non plus de centaines mais de milliers de cellules, la puissance de l'essai s'en trouve accrue. Enfin, étant donné que les micronoyaux peuvent être issus de chromosomes retardataires, l'essai peut permettre de détecter la présence d'agents inducteurs d'aneuploïdie, difficiles à étudier lors de tests d'aberration chromosomique classiques, tels que celui décrit dans la ligne directrice n° 473 de l'OCDE (chapitre B.10 de la présente annexe) (17). Toutefois, l'essai MNvit ne permet pas de différencier les substances chimiques induisant la polyploïdie de celles induisant la clastogénicité sans avoir recours à des techniques spécifiques, telles que la méthode FISH citée au paragraphe 2.

4. L'essai MNvit est une méthode d'essai *in vitro* utilisant généralement des cultures de cellules humaines ou de rongeur. Grâce à sa capacité de mise en évidence d'agents aneugènes et clastogènes, il constitue un outil de base complet pour l'étude *in vitro* du potentiel de lésions chromosomiques.
5. L'essai MNvit est efficace et fiable sur plusieurs types de cellules, et en présence ou en l'absence de cytoB. La validité de l'essai MNvit est attestée par de nombreuses données, et ce avec l'utilisation de différentes lignées cellulaires issues de rongeurs (CHO, V79, CHL/IU et L5178Y) et de lymphocytes humains (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Ces données proviennent notamment des études internationales de validation coordonnées par la Société française de toxicologie génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) et des rapports de l'International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Les données disponibles ont en outre fait l'objet d'une nouvelle évaluation lors d'une étude de validation rétrospective fondée sur le poids de la preuve, réalisée par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) de la Commission européenne. Cette méthode d'essai a été déclarée scientifiquement valable par le comité consultatif scientifique de l'ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). L'utilisation d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine TK6 (35), de cellules HepG2 (36) (37) et de cellules embryonnaires primaires de hamster syrien (38) a été décrite mais n'a pas été retenue dans les études de validation.

DÉFINITIONS

6. Les définitions des termes employés sont présentées à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les substances d'essai, les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*. Il convient aussi d'éviter d'introduire des conditions qui conduiraient à de faux résultats positifs ne reflétant pas une mutagenicité intrinsèque, et pouvant provenir de facteurs tels que des modifications importantes du pH ou de l'osmolalité, ou une forte cytotoxicité (39) (40) (41). En cas de modification du pH du milieu par la substance chimique d'essai lors de son adjonction, il convient d'ajuster le pH, de préférence en tamponnant la solution mère de façon que tous les volumes restent identiques pour toutes les concentrations d'essai et tous les témoins.
8. Afin que l'analyse de l'induction de micronoyaux soit valable, il est essentiel que la mitose se soit produite aussi bien dans les cultures traitées et que dans les cultures non traitées. Pour que son intérêt soit maximal, la numération des micronoyaux est effectuée dans les cellules ayant achevé une mitose durant ou après l'application de la substance d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. Les cultures cellulaires d'origine humaine ou mammifère sont exposées à la substance d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines. Tous les essais prévoient l'utilisation de témoins parallèles de solvant/véhicule et de témoins positifs.
10. Durant ou après l'exposition à la substance d'essai, les cellules sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou fusoriale conduise à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. La substance d'essai est normalement présente au cours de la mitose pour qu'il y ait induction d'une aneuploïdie. Les cellules récoltées en interphase sont teintées et soumises à analyse pour déceler la présence de micronoyaux. En principe, la numération des micronoyaux ne devrait être réalisée que dans les cellules ayant effectué une mitose durant l'exposition à la substance d'essai, ou pendant la période de postexposition, si l'essai la prévoit. Dans les cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, la numération n'est effectuée que sur les cellules binucléées. En l'absence d'agent de blocage de la cytokinèse, il importe de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose pendant ou après l'exposition à la substance d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées. Le degré de cytotoxicité ou de cytostase induit par la substance d'essai est évalué pour les cultures (ou des cultures parallèles) dans lesquelles est réalisée la numération des micronoyaux.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Préparations

11. L'emploi de lymphocytes primaires du sang périphérique humain en culture (5) (19) (42) (43) et de plusieurs lignées cellulaires issues de rongeurs, telles que des cellules CHO, V79, CHL/IU et L5178Y, est possible dans le cadre de cet essai (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Tout recours à d'autres lignées cellulaires ou d'autres types de cellules est justifié via la démonstration de leur performance pour l'essai, ainsi qu'il est indiqué dans la section sur les critères d'acceptabilité. Dans la mesure où la fréquence des micronoyaux généralement constatée pour un type de cellule aura une influence sur la sensibilité de l'essai, il est recommandé d'utiliser des types de cellules pour lesquelles la fréquence habituelle de formation de micronoyaux est faible et stable.

12. Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), sains, non fumeurs et n'ayant pas subi récemment d'exposition connue à des rayonnements ou des substances chimiques génotoxiques. Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. La fréquence des micronoyaux augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (44). Cela est pris en compte lors du choix des donneurs pour une mise en commun des cellules.

Milieu et conditions de culture

13. Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, concentration de CO₂, température et humidité) appropriés pour les cultures. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires établies et les souches cellulaires, qui sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype sont constatées. La durée normale du cycle cellulaire dans les conditions de culture appliquées par le laboratoire d'essai doit être connue. En cas de recours à la méthode du blocage de la cytokinèse, la concentration de l'inhibiteur de la cytokinèse est adaptée au type de cellule utilisé, et preuve est faite de son aptitude à produire suffisamment de cellules binucléées pour pouvoir procéder à une numération.

Préparation des cultures

14. Lignées cellulaires établies et souches cellulaires: les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans le milieu de culture à une densité telle qu'elles ne recouvrent pas entièrement la surface du milieu, sur une seule couche, et que les cultures en suspension n'atteindront pas une densité excessive avant le moment de la récolte, et incubées à 37 °C.
15. Lymphocytes: un sang total traité avec un anticoagulant (ex.: héparine) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture en présence d'un mitogène [ex: phytohéماغلutine (PHA)] avant l'exposition à la substance d'essai et à la cytoB.

Activation métabolique

16. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs traités avec des inducteurs enzymatiques, par exemple l'Aroclor 1254 (45) (46) ou un mélange de phénobarbitone et β -naphthoflavone (46) (47) (48) (49). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (50) ni au règlement (CE) n° 850/2004 concernant les polluants organiques persistants (66) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (46) (47) (48) (49). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut y avoir avantage à utiliser plus d'une concentration de la fraction S9.
17. Des lignées cellulaires génétiquement modifiées pour produire des enzymes activantes spécifiques, humaines ou de rongeur, peuvent éliminer le besoin de recourir à un système d'activation métabolique exogène, et peuvent être utilisées comme cellules d'essai. Dans ce cas, le choix des lignées cellulaires utilisées est justifié scientifiquement, par exemple par la pertinence des oxydases à fonction mixte pour le métabolisme de la substance d'essai (51) et par leur réactivité aux clastogènes et aneugènes connus (voir la section sur les critères d'acceptabilité). Il convient de prendre en considération le fait que la substance d'essai peut ne pas être métabolisée par la ou les oxydases à fonction mixte exprimées, auquel cas des résultats négatifs n'indiqueraient pas que la substance d'essai n'est pas un inducteur de micronoyaux.

Préparation de la substance d'essai

18. Les substances chimiques solides sont dissoutes dans un véhicule ou un solvant approprié puis, le cas échéant, diluées avant application. Les substances chimiques liquides peuvent être ajoutées telles quelles ou après dilution au système d'essai. Les essais de substances chimiques gazeuses ou volatiles nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients hermétiquement clos (52) (53). Il convient d'utiliser des préparations fraîches sauf si l'on dispose de données démontrant la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Conditions expérimentales

Solvants/véhicules

19. Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9 à la concentration employée. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel (autre que l'eau, le milieu de culture cellulaire ou le diméthylsulfoxyde, notamment) est justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec la substance d'essai et de son absence de génotoxicité. Il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux.

Utilisation de la cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse

20. Il est essentiel, pour garantir l'efficacité de la méthode d'essai MNvit, que les cellules faisant l'objet d'une numération aient bien effectué une mitose au cours de l'application ou pendant la période d'incubation qui suit le traitement, le cas échéant. La cytoB est l'agent le plus couramment utilisé pour bloquer la cytokinèse, car elle inhibe l'assemblage de l'actine, empêchant la séparation des cellules-filles après la mitose, d'où la formation de cellules binucléées (5) (54) (55). Ainsi, la numération des micronoyaux peut être limitée aux cellules ayant effectué une mitose pendant ou après le traitement. L'effet de la substance d'essai sur la cinétique de prolifération cellulaire peut être mesuré de façon concomitante. L'usage de cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse est indiqué lors de l'utilisation de lymphocytes humains car la durée du cycle cellulaire est variable selon les cultures et les donneurs, et car tous les lymphocytes ne réagissent pas à la PHA. D'autres méthodes existent pour déterminer si les cellules des lignées cellulaires utilisées et faisant l'objet d'une numération ont effectué une mitose; ces méthodes sont détaillées ci-dessous (voir paragraphe 26).
21. Pour chaque type de cellule, le laboratoire détermine la concentration de cytoB permettant d'obtenir la fréquence optimale de cellules binucléées dans les cultures témoins traitées uniquement au solvant/véhicule. La concentration appropriée de cytoB se situe habituellement entre 3 et 6 µg/ml.

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'exposition

22. Lors de la détermination de la plus forte concentration de substance d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive, une précipitation dans le milieu de culture ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (39) (40) (41).
23. Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer que les cellules traitées ont bien effectué une mitose au cours de l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphe 29). La cytotoxicité est déterminée avec et sans activation métabolique dans les cellules nécessitant une telle activation, via la mesure de l'augmentation relative du nombre de cellules ou le doublement relatif de la population (voir les formules à l'appendice 2), sauf si l'on utilise la cytoB, auquel cas la cytotoxicité peut être déterminée grâce à l'indice de réplication (voir la formule à l'appendice 2).
24. L'application de cytoB sur les cultures, et la mesure des fréquences relatives de cellules mononucléées, binucléées et multinucléées dans chaque culture, offrent un moyen précis de quantifier l'effet d'un traitement sur la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique ou cytostatique (5), et d'assurer que seules les cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'application sont prises en compte.
25. Dans les études faisant appel à la cytoB, la cytotase/cytotoxicité peut être quantifiée au moyen de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (cytokinesis-block proliferation index, ou CBPI) (5) (26) (56) ou déduite de l'indice de réplication (RI) à partir d'au moins 500 cellules par culture (voir les formules à l'appendice 2). Lorsque la cytoB est utilisée pour évaluer la prolifération cellulaire, un CBPI ou RI est défini à partir d'au moins 500 cellules par culture. Ces mesures peuvent servir, parmi d'autres, à estimer la cytotoxicité en comparant les valeurs obtenues pour les cultures traitées et les cultures témoins. L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité (ex.: degré de confluence, nombre de cellules, apoptose, nécrose, comptage des cellules en métaphase) peut fournir des informations utiles.
26. Dans les études sans cytoB, il est nécessaire de démontrer que les cellules faisant l'objet d'une numération ont effectué une division cellulaire durant ou après l'exposition à la substance d'essai, faute de quoi on risque de produire de fausses réponses négatives. Les méthodes utilisées pour garantir que les cellules évaluées ont bien été divisées comprennent l'incorporation puis la détection de bromodéoxyuridine (BrdU) afin d'identifier les cellules répliquées (57), la formation de clones lorsque des cellules provenant de lignées cellulaires permanentes sont traitées et dénombrées in situ sur une lame de microscope (Indice de prolifération PI) (25) (26) (27) (28), la mesure du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou encore d'autres méthodes validées (16) (56) (58) (59) (voir les formules à l'appendice 2). L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité ou de cytotase (ex.: degré de confluence, nombre de cellules, apoptose, nécrose, comptage des cellules en métaphase) peut fournir des informations utiles.
27. Il convient d'évaluer au moins trois concentrations analysables. À cette fin, il peut être nécessaire de réaliser l'expérience en utilisant un plus grand nombre de concentrations peu espacées, et d'analyser la formation des micronoyaux pour les concentrations présentant la fourchette de cytotoxicité appropriée. Il est également possible de réaliser un essai de cytotoxicité préliminaire afin de réduire le spectre de l'essai définitif.
28. La concentration maximale vise à produire un taux de cytotoxicité de 55 ± 5 %. Des concentrations plus fortes peuvent induire des lésions chromosomiques comme effet secondaire de la cytotoxicité (60). En présence d'une substance cytotoxique, les concentrations retenues couvrent un domaine allant d'une cytotoxicité nulle ou légère à une cytotoxicité de 55 ± 5 %.

29. Quand aucune cytotoxicité ni précipité n'est observé, la concentration maximale est la plus basse des trois concentrations suivantes: 0,01 M, 5 mg/mL ou 5 µl/mL. Les concentrations retenues pour l'expérience sont généralement séparées par un facteur de 10 au maximum. Pour les substances d'essai présentant une courbe concentration-réponse caractérisée par une forte pente, il peut être nécessaire de réduire ce facteur de séparation de façon à pouvoir analyser les cultures des plages de toxicité inférieures et moyennes.
30. Lorsque la solubilité est un facteur limitant, la concentration maximale, si elle n'est pas limitée par la cytotoxicité, correspond à la concentration la plus faible permettant d'observer une précipitation minimale dans les conditions de culture, sous réserve que le précipité n'interfère pas avec la numération. L'évaluation de la précipitation est réalisée selon des méthodes telles que la microscopie optique, en notant tout précipité persistant ou apparaissant durant la période de culture (avant la fin du traitement).
- Témoins
31. Il convient d'inclure dans chaque expérience des témoins positifs et des témoins de solvant/véhicule, avec et sans activation métabolique.
32. Des témoins positifs sont nécessaires pour démontrer que les cellules utilisées, et le protocole d'essai, permettent bien d'identifier les agents clastogènes et aneugènes, et prouver la capacité métabolique de la préparation S9. Les témoins positifs font appel à des inducteurs connus de formation de micronoyaux à des concentrations susceptibles d'entraîner une augmentation faible, mais reproductible, de la fréquence de fond, et de démontrer la sensibilité du système d'essai. Les concentrations des témoins positifs sont choisies de manière que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour celui qui les interprète.
33. Un clastogène nécessitant une activation métabolique (par exemple: cyclophosphamide; benzo[a]pyrène) est utilisé pour démontrer d'une part la compétence métabolique et d'autre part l'aptitude du système d'essai à détecter les clastogènes. D'autres témoins positifs peuvent être utilisés si cela est justifié. Certains témoins positifs qui nécessitent une activation métabolique étant parfois actifs sans activation métabolique exogène dans certaines conditions de traitement ou chez certaines lignées cellulaires, la nécessité d'avoir recours à une activation métabolique, ainsi que l'activité de la préparation S9, sont démontrées pour la lignée cellulaire retenue et pour les concentrations sélectionnées.
34. À l'heure actuelle, aucun aneugène connu ne nécessite une activation métabolique pour présenter une activité génotoxique (16). Les témoins positifs actuellement acceptés pour l'activité aneugénique sont, notamment, la colchicine et la vinblastine. D'autres substances et mélanges chimiques peuvent être utilisés si ils induisent des micronoyaux uniquement, ou principalement, via leur activité aneugénique. Pour éviter d'avoir recours à deux témoins positifs (pour la clastogénicité et l'aneugénicité) sans activation métabolique, le témoin d'aneugénicité peut servir de témoin positif sans S9, et le témoin de clastogénicité peut être utilisé pour éprouver le caractère approprié du système d'activation métabolique utilisé. Les témoins positifs tant pour la clastogénicité que pour l'aneugénicité sont utilisés pour des cellules ne nécessitant pas de préparation S9. Les témoins positifs suggérés sont indiqués à l'appendice 3.
35. Le recours à des témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, si des substances chimiques appropriées sont disponibles. Tous les témoins positifs utilisés sont adaptés au type de cellule concerné et aux conditions d'activation.
36. Des témoins de solvant/véhicule sont inclus au moment de chaque récolte. En outre, des témoins négatifs non traités (sans solvant/véhicule) sont aussi utilisés à moins que des données publiées ou issues d'essais témoins réalisés antérieurement par le laboratoire ne démontrent que le solvant choisi n'a pas d'action génotoxique ou d'autre effet délétère aux concentrations retenues.

MODE OPÉRATOIRE

Déroulement du traitement

37. Afin d'augmenter au maximum la probabilité de détecter une action aneugène ou clastogène à un stade précis du cycle cellulaire, il importe qu'un nombre suffisant de cellules reçoive une application de la substance d'essai à tous les stades du cycle cellulaire. Le déroulement du traitement pour les lignées cellulaires et les cultures de cellules primaires peut donc différer quelque peu de celui pour les lymphocytes qui nécessitent une stimulation mitogénique pour débiter leur cycle cellulaire, ce qui est détaillé aux paragraphes 41-43 (16).
38. Les études théoriques et les données publiées (18) indiquent que la plupart des aneugènes et clastogènes sont détectés à l'issue d'une application de courte durée, comprise entre 3 et 6 heures, en présence et en l'absence de préparation S9, suivie du retrait de la substance d'essai et d'une période de croissance équivalente à 1,5 à 2,0 cycles cellulaires (6). Les échantillons de cellules sont prélevés après un temps correspondant à 1,5 à 2,0 fois la durée du cycle cellulaire normal (c'est-à-dire sans traitement) après le début du traitement ou à la fin du traitement (voir tableau 1). Les durées d'échantillonnage ou de récupération peuvent être allongées s'il est connu ou supposé que la substance d'essai affecte la durée du cycle cellulaire (par exemple si l'essai porte sur des analogues de nucléosides).

39. En raison de la cytotoxicité potentielle des préparations S9 pour les cellules de mammifères cultivées, le traitement d'exposition prolongée correspondant à 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux n'est utilisé qu'en l'absence de préparation S9. Dans les protocoles de traitement prolongé, différents choix sont possibles pour permettre l'application de la substance d'essai sur les cellules en présence ou en l'absence de cytoB. Ces différents choix sont à faire en fonction des craintes d'interaction entre la substance d'essai et la cytoB.
40. Le tableau 1 présente les différents déroulements proposés pour le traitement. Ces déroulements de traitement généraux peuvent être modifiés en fonction de la stabilité et de la réactivité de la substance d'essai, ou des caractéristiques de croissance des cellules utilisées. Toutes les applications débutent et s'achèvent pendant la phase de croissance exponentielle des cellules. Ces déroulements sont présentés plus en détail dans les paragraphes 41 à 47 ci-dessous.

Tableau 1

Traitement des cellules et temps de récolte pour l'essai MNvit

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires traités avec application de cytoB	+ S9	Traiter pendant 3 à 6 heures en présence de S9; éliminer la préparation S9 et le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.
	– S9 Exposition courte	Traiter pendant 3 à 6 heures; éliminer le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.
	– S9 Exposition prolongée	Option A: traiter pendant 1,5 à 2 cycles cellulaires normaux en présence de cytoB; récolter à la fin de la période d'exposition. Option B: traiter pendant 1,5 à 2 cycles cellulaires normaux; éliminer la substance d'essai; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.

Lignées cellulaires traitées sans application de cytoB
(mode de traitement identique à celui décrit ci-dessus, sauf que l'on n'ajoute pas de cytoB)

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires avec cytoB

41. Pour les lymphocytes, la méthode la plus efficace consiste à démarrer l'exposition à la substance d'essai 44 à 48 heures après la stimulation par la PHA, une fois la synchronisation du cycle cellulaire disparue (5). Lors de l'essai initial, la substance d'essai est appliquée pendant 3 à 6 heures, en présence et en l'absence de S9. Le milieu de traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais contenant de la cytoB, puis les cellules sont récoltées après un laps de temps correspondant à 1,5 à 2,0 fois le cycle cellulaire normal.
42. Si les résultats des deux essais initiaux de traitement court (3-6 heures) sont négatifs ou équivoques, un autre traitement plus long est appliqué par la suite (sans S9). Deux traitements différents, également acceptables, sont possibles. Toutefois, il peut s'avérer plus approprié de suivre l'option A pour les lymphocytes stimulés, dont la croissance exponentielle peut décliner 96 heures après la stimulation. Par ailleurs, il convient que les cultures de cellules ne recouvrent pas entièrement la surface du milieu avant l'échantillonnage final dans le cadre de l'option B:
- Option A: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux, et récoltées à la fin du traitement.
 - Option B: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux. Le milieu de traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais, puis les cellules sont récoltées après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux supplémentaires.
43. Le traitement des cellules primaires et des lignées cellulaires est identique à celui des lymphocytes, à l'exception du fait que la stimulation par PHA pendant 44 à 48 heures n'est pas nécessaire. Les cellules autres que les lymphocytes sont exposées de telle sorte qu'à la fin de l'étude, elles n'aient pas dépassé la phase de croissance exponentielle.

Lignées cellulaires sans cytoB

44. Les cellules sont traitées pendant 3 à 6 heures en présence et en l'absence de S9. Le milieu du traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais, puis les cellules sont récoltées après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.
45. Si les résultats des deux essais initiaux de traitement court (3-6 heures) sont négatifs ou équivoques, un autre traitement plus long est appliqué par la suite (sans S9). Deux traitements différents, également acceptables, sont possibles:
- Option A: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux, et récoltées à la fin du traitement.
 - Option B: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux. Le milieu de traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais, puis les cellules sont récoltées après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux supplémentaires.
46. Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant la substance d'essai. Afin d'éviter la perte de cellules en mitose qui sont susceptibles de former des micronoyaux, il convient donc de les recueillir avec soin lors du lavage des cultures puis de les y réintroduire au moment de la récolte.

Nombre de cultures

47. Il convient de réaliser des cultures dupliquées pour chaque concentration de la substance d'essai, ainsi que pour les véhicules/solvants et les témoins négatifs. Si des résultats de laboratoire antérieurs ont démontré que la variation entre les cultures dupliquées est minimale, l'utilisation d'une seule culture pour chaque concentration peut être envisagée. En cas d'utilisation de cultures uniques, il est recommandé d'analyser un plus grand nombre de concentrations.

Récolte des cellules et préparation des lames

48. Chaque culture fait l'objet d'une récolte et d'un traitement séparés. La préparation des cellules peut comporter un traitement hypotonique, mais cette étape n'est pas indispensable si les cellules sont correctement étalées par un autre biais. Différentes méthodes peuvent être employées pour la préparation des lames, à condition que les préparations cellulaires obtenues pour la numération soient de très bonne qualité. Le cytoplasme cellulaire est conservé pour permettre la détection d'éventuels micronoyaux et (dans la méthode du blocage de la cytokinèse) le repérage fiable des cellules binucléées.
49. Les lames peuvent être colorées par différentes méthodes, au Giemsa ou à l'aide de colorants fluorescents spécifiques de l'ADN, par exemple (59). L'emploi d'un colorant spécifique [tel que l'orange d'acridine (61) ou Hoechst 33258 plus pyronine-Y (62)] permet d'éliminer une partie des artefacts dus à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Les anticorps anti-kinétochore, la méthode FISH associée à des sonde ADN pancentromériques ou encore le marquage in situ par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié, peuvent être utilisés pour identifier le contenu (chromosomes/fragments chromosomiques) des micronoyaux si les informations d'ordre mécanistique concernant leur formation présentent de l'intérêt (15) (16). D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée.

Analyse

50. Toutes les lames, y compris celles du solvant/véhicule et des témoins, sont codées individuellement avant l'analyse au microscope. Il est également possible d'analyser des échantillons codés à l'aide d'un système automatisé et préalablement validé de cytométrie en flux ou d'analyse d'images.
51. Dans les cultures traitées à la cytoB, la fréquence des micronoyaux est analysée dans au minimum 2 000 cellules binucléées par concentration (au moins 1 000 cellules binucléées par culture; deux cultures par concentration). Dans le cas de cultures en un seul exemplaire, il conviendra d'examiner au minimum 2 000 cellules binucléées par concentration. Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture, ou à 2 000 en cas de culture en un seul exemplaire, et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins élevées, suivant la situation. Il convient également de veiller à ne pas comptabiliser les cellules binucléées ayant une forme irrégulière ou dont les deux noyaux présentent une différence de taille trop importante. De même, les cellules binucléées ne doivent pas être confondues avec des cellules multinucléées mal étalées. Les cellules possédant plus de deux noyaux principaux ne sont pas analysées, car la fréquence de référence des micronoyaux est susceptible d'être plus élevée dans ce type de cellules (63) (64). La numération des cellules mononucléées peut être envisagée s'il s'avère que la substance d'essai interfère avec l'action de la cytoB.

52. Pour les lignées cellulaires n'ayant pas reçu de cytoB, il convient d'examiner les micronoyaux d'au moins 2 000 cellules par concentration (1 000 cellules au minimum par culture; deux cultures par concentration). Dans le cas d'une culture en un seul exemplaire par concentration, 2 000 cellules au moins sont examinées.
53. Lorsque l'essai est réalisé en présence de cytoB, il convient de déterminer un CBPI ou un indice de réplication (RI) afin d'évaluer la prolifération cellulaire (voir appendice 2), en utilisant 500 cellules au moins par culture. Lorsque les traitements sont effectués en l'absence de cytoB, il est essentiel de faire la preuve que les cellules analysées ont proliféré (voir paragraphes 24 à 27).

Critères d'acceptabilité

54. Tout laboratoire proposant de recourir à l'essai MNvit décrit dans la présente méthode d'essai démontre qu'il est à même de détecter de manière fiable et précise des substances et mélanges chimiques dont le pouvoir aneugène ou clastogène est connu, avec et sans activation métabolique, ainsi que des substances chimiques négatives connues, en employant les produits chimiques de référence indiqués à l'appendice 3. Pour attester de son aptitude à mettre en œuvre cette méthode d'essai correctement, le laboratoire démontre que les cellules dont les micronoyaux sont dénombrés ont bien effectué une division nucléaire si l'essai est réalisé sans cytoB.
55. Il est recommandé d'utiliser comme produits de référence les produits chimiques figurant à l'appendice 3. Des produits chimiques de substitution ou supplémentaires peuvent être utilisés si leur activité est connue, s'ils induisent la formation de micronoyaux via les mêmes mécanismes d'action et si leur pertinence est prouvée pour les substances d'essai dans le cadre de la procédure MNvit. La justification pourra inclure une étude de validation couvrant une grande diversité de substances ou axée sur un spectre plus étroit, limité à la classe chimique de la substance d'essai ou au mécanisme de lésion étudié.
56. Le témoin du solvant/véhicule et les cultures non traitées présentent des fréquences reproductibles de micronoyaux faibles et cohérentes (de l'ordre de 5 à 25 micronoyaux/1 000 cellules pour les types de cellules cités au paragraphe 11). D'autres types de cellules peuvent présenter des fourchettes de réponse différentes, qui devront être déterminées lors de leur validation pour l'essai MNvit. Il conviendra d'utiliser les données issues des témoins négatifs, du solvant, et positifs pour établir des fourchettes de référence. Ces données serviront à déterminer si les témoins négatifs/positifs sont appropriés pour réaliser un essai.
57. S'il est proposé d'apporter de légères modifications au protocole d'essai (par exemple l'utilisation de techniques de numération automatisées et non manuelles, ou le recours à un nouveau type de cellule), l'efficacité de ces changements est démontrée afin que le protocole modifié soit considéré comme acceptable. Il convient notamment de démontrer que les mécanismes principaux de cassure, de perte ou de gain chromosomique peuvent être détectés, et que des résultats positifs et négatifs appropriés peuvent être obtenus pour la classe de la substance concernée, ou pour tout le spectre des substances à tester.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

58. Lorsque la technique du blocage de la cytokinèse est employée, seules les fréquences des cellules binucléées présentant des micronoyaux (indépendamment du nombre de micronoyaux par cellule) sont utilisées pour évaluer l'induction de micronoyaux. La numération des cellules présentant un ou plusieurs micronoyaux est susceptible d'apporter des informations intéressantes, mais est optionnelle.
59. Il convient d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et/ou de cytostase pour toutes les cultures traitées et les cultures témoins traitées uniquement avec le solvant/véhicule (58). Il faut également calculer le CBPI ou l'indice de réplication (RI) pour toutes les cultures traitées et témoins, afin de mesurer le retard du cycle cellulaire en cas de recours à la méthode de blocage de la cytokinèse. En l'absence de cytoB, il convient de mesurer le doublement relatif de la population (RPD), l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou l'indice de prolifération (PI) (voir appendice 2).
60. Les données sont indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux.
61. Lorsque des produits chimiques induisent la formation de micronoyaux lors de l'essai MNvit, celle-ci est due soit à une cassure chromosomique, soit à une perte chromosomique, soit aux deux événements combinés. D'autres analyses utilisant des anticorps anti-kinétochores, des sondes centromériques in situ ou d'autres méthodes permettent de déterminer si le mécanisme d'induction des micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène.

Évaluation et interprétation des résultats

62. Il n'est pas requis de vérifier par le biais d'expériences supplémentaires une réponse positive ou négative claire. Il est possible qu'un résultat ambigu soit clarifié en analysant 1 000 cellules supplémentaires issues de l'ensemble des cultures afin de conserver le caractère aveugle de l'essai. Si cette approche ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants, des expériences supplémentaires sont réalisées. Dans le cadre des expériences supplémentaires ainsi réalisées, on envisagera de modifier les paramètres de l'étude, afin d'en élargir ou d'en restreindre les conditions, selon le cas. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'espacement des niveaux de concentration, le calendrier des traitements et de la récolte des cellules et/ou les conditions de l'activation métabolique.

63. Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment une augmentation liée à la concentration ou statistiquement significative du nombre de cellules présentant des micronoyaux. Il convient en premier lieu de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. Le fait que les valeurs observées soient ou non comprises dans la fourchette de référence peut fournir des indices utiles à l'évaluation de la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques appropriées (65). Toutefois, les résultats des tests statistiques sont évalués en tenant compte de la relation dose-réponse. La reproductibilité et les données historiques sont également prises en compte.
64. Bien que la plupart des expériences donnent des résultats clairement positifs ou négatifs, il arrive que l'ensemble des résultats d'un essai ne permette pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance d'essai. Ces résultats équivoques ou discutables peuvent survenir indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.
65. Des résultats positifs dans un essai MNvit indiquent que la substance d'essai induit une cassure ou une perte chromosomique dans des cellules de mammifère en culture. Des résultats négatifs indiquent que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas de cassure et/ou de gain ou de perte chromosomique dans des cellules de mammifère en culture.

Rapport d'essai

66. Le rapport d'essai contient au minimum les informations suivantes, si elles sont pertinentes pour la conduite de l'étude:

Substance chimique d'essai:

- données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) et numéro CE,
- état physique et pureté,
- propriétés physico-chimiques importantes pour l'exécution de l'essai,
- réactivité de la substance chimique d'essai avec le solvant/véhicule ou le milieu de culture cellulaire.

Solvant/véhicule:

- justification du choix du solvant ou véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant ou véhicule.

Cellules:

- type et source des cellules utilisées,
- raisons du choix du type cellulaire utilisé,
- absence de mycoplasme, le cas échéant,
- données sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération,
- en cas d'utilisation de lymphocytes, sexe, âge et nombre de donneurs de sang, s'il y a lieu,
- en cas d'utilisation de lymphocytes, préciser si du sang total ou des lymphocytes isolés sont exposés,
- nombre de repiquages, le cas échéant,
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, s'il y a lieu,
- nombre modal de chromosomes,
- durée normale du cycle cellulaire (témoin négatif).

Conditions de l'essai:

- identité de l'éventuel agent de blocage de la cytokinèse utilisé (cytoB, par exemple), sa concentration et la durée d'exposition des cellules,
- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, s'il y a lieu,

- composition du milieu et, le cas échéant, concentration de CO₂,
- concentration de la substance d'essai,
- concentration (et/ou volume) de véhicule et de substance d'essai ajoutés,
- température et temps d'incubation,
- durée du traitement,
- délai de récolte après application,
- densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- témoins positifs et négatifs,
- méthodes de préparation des lames et techniques de coloration utilisées,
- critères d'identification des micronoyaux,
- nombre de cellules analysées,
- méthodes de mesure de la cytotoxicité,
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité,
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque,
- méthode(s) d'analyse statistique utilisée(s),
- méthodes, telles que le recours aux anticorps anti-kinétochores, utilisées pour déterminer si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant.

Résultats:

- mesure de cytotoxicité utilisée, par exemple CBPI ou RI dans le cas de la méthode de blocage de la cytokinèse; RICC, RPD ou PI lorsque la méthode de blocage de la cytokinèse n'est pas utilisée; autres observations le cas échéant, telles que degré de confluence cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, fréquence des cellules binucléées,
- signes de précipitation,
- données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées,
- définition des cellules acceptables pour l'analyse,
- répartition des cellules mono-, bi- et multinucléées en cas d'utilisation d'une méthode de blocage de la cytokinèse,
- nombre de cellules micronucléées, donné séparément pour chaque culture traitée et culture témoin, en précisant si elles proviennent de cellules binucléées ou mononucléées, s'il y a lieu,
- relation concentration-réponse, si possible,
- données (concentrations et solvants) concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs concomitants,
- données historiques concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts types et intervalle de confiance (95 % par exemple),
- analyse statistique; valeurs P le cas échéant.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

1. Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test, *Mutation Res.*, 392, 1-4.
2. Parry, J.M. et Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
3. Fenech, M. et Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
4. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. et Wakata, A. (2000), Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
5. Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
6. Fenech, M. et Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in-vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
7. Eastmond, D.A. et Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
8. Eastmond, D.A. et Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in-situ hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
9. Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. et Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
10. Farooqi, Z., Darroudi, F. et Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence in-situ hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
11. Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. et Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
12. Norppa, H., Renzi, L. et Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.
13. Eastmond, D.A., Rupa, D.S. et Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.
14. Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. et Bentley, K.S. (1996), Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.
15. Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. et Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence in situ hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.
16. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. et Wakata, A. (2003), Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutation Res.*, 540, 153-163.
17. OCDE (1997), Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères, Ligne directrice n° 473, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OECD, Paris.[disponible à l'adresse: www.oecd.org/env/testguidelines].

18. Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G. et Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on in vitro micronucleus test, I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Res.*, 607, 13-36.
19. Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.
20. Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Res.*, 607, 61-87.
21. Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Res.*, 607, 88-124.
22. Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Res.*, 607, 125-152.
23. Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. et Locher, F. (1997), Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.
24. Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. et Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.
25. Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. et Madle, S. (1998), Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test, *Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung. Mutation Res.*, 410, 81-116.
26. Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. et Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
27. Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. et Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
28. von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gortitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. et Madle, S. (2000), In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.
29. Garriott, M.L., Phelps, J.B. et Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.
30. Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. et Sofuni, T. (1999), Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.
31. Elhajouji, A., et Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on in vitro micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.
32. CEVMA (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing, 25^e réunion de l'ESAC, 16-17 novembre, 2006, disponible à l'adresse: <http://ecvam.jrc.it/index.htm> (en anglais).
33. ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the In Vitro Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Disponible à l'adresse: <http://ecvam.jrc.it/index.htm> (en anglais).

34. Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of in vitro Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.
35. Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. et Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.
36. Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. et Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
37. Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. et Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxics; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.
38. Gibson, D.P., Brauningner, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. et Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
39. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. et Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-205.
40. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. et Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
41. Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
42. Fenech, M. et Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
43. Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
44. Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. et Zijno, A. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.
45. Maron, D.M. et Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
46. Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. et Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
47. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. et Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in-vitro genotoxicity assays, *Mutagenesis*, 7, 175-177.
48. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. et Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds). *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, p. 85-88.
49. Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. et Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
50. PNUE (2001), Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, Programme des Nations unies pour l'environnement (ONUE). Disponible sur: [<http://www.pops.int/>] (en anglais).

51. Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. et Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
52. Krahn, D.F., Barsky, F.C. et McCooley, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, p. 91-103.
53. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. et Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.
54. Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
55. Phelps, J.B., Garriott, M.L., et Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
56. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallès, J., Vanhauwaert, A. et Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the in vitro micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97-100.
57. Pincu, M., Bass, D. et Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
58. Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. et Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test, I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
59. Surrallès, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. et Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
60. Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
61. Hayashi, M., Sofuni, T., et Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
62. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., et Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
63. Hayashi, M., Sofuni, T. et Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
64. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. et Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
65. Hoffman, W.P., Garriott, M.L. et Lee, C. (2003), In vitro micronucleus test. In: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition, S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, p. 463-467.
66. Règlement (CE) n° 850/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant les polluants organiques persistants et modifiant la directive 79/117/CEE, JO L 229 du 30.4.2004, p. 5.

Appendice 1

Définitions

Aneugène: Substance ou processus qui, *via* des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

Aneuploïdie: Tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose: Mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC): Méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Cellules en interphase: Cellules qui ne sont pas en phase de mitose.

Centromère: Région de l'ADN d'un chromosome où les deux chromatides sont reliées entre elles et sur laquelle les deux kinétochores sont fixés côte à côte.

Clastogène: Substance ou processus induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations cellulaires ou des organismes.

Cytokinèse: Processus de division cellulaire survenant immédiatement après la mitose pour former deux cellules-filles, contenant chacune un noyau unique.

Cytostase: Inhibition de la croissance cellulaire (voir formule à l'appendice 2).

Cytotoxicité: Effets dommageables sur la structure ou les fonctions cellulaires, entraînant *in fine* la mort cellulaire.

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD): Méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Génotoxique: Terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice de prolifération (PI): Méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (Cytokinesis-Block Prolifération Index, CBPI): Proportion de cellules issues de la deuxième division dans la population traitée par rapport au témoin non traité (voir formule à l'appendice 2).

Indice de réplication (Replication Index, RI): Rapport entre le nombre de cycles de division cellulaire achevés dans une culture traitée et ce même nombre dans le témoin non traité, au cours de la période d'exposition et de récupération (voir formule à l'appendice 2).

Indice mitotique: Rapport entre le nombre de cellules en métaphase et le nombre total de cellules observées dans une population cellulaire; il donne une indication du degré de prolifération cellulaire de cette population.

Kinétochore: Assemblage de protéines situé au niveau du centromère d'un chromosome, auquel sont associées les fibres fusoriales lors de la division cellulaire, permettant le mouvement ordonné des chromosomes-fils vers les pôles des cellules-filles.

Micronoyau: Petit noyau, venant s'ajouter au noyau principal de la cellule et séparé de celui-ci, formé lors de la télophase de la mitose ou de la méiose à partir de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes retardataires.

Mitose: Division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: Se dit d'un agent produisant une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Non-disjonction: Non-séparation d'une paire de chromatides, qui ne parviennent donc pas à migrer correctement lors de la division cellulaire, ce qui entraîne la présence d'un nombre anormal de chromosomes dans les cellules-filles.

Polyploïdie: Aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Prolifération cellulaire: Augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Substance chimique d'essai (également dénommée substance d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Formules pour l'évaluation de la cytotoxicité

1. En cas d'utilisation de la cytoB, l'évaluation de la cytotoxicité se fonde sur l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou sur l'indice de réplication (RI) (16) (58). Le CBPI indique le nombre moyen de cycles cellulaires par cellule effectués au cours de la période d'exposition à la cytoB, et peut servir au calcul de la prolifération cellulaire. Le RI indique le nombre relatif de noyaux présents dans les cultures traitées par rapport aux cultures témoin, et peut servir au calcul du pourcentage de cytostase:

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

Avec:

T = culture traitée avec la substance chimique d'essai

C = culture témoin véhicule

Où:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{nb de cellules mononucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules binucléées}) + (3 \times \text{nb de cellules multinucléées}))}{(\text{Nombre total de cellules})}$$

Ainsi, un CBPI égal à 1 (toutes les cellules sont mononucléées) équivaut à une cytostase de 100 %.

$$\text{Cytostase} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{Nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) \div (\text{Nombre total de cellules})_T}{((\text{Nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) \div (\text{Nombre total de cellules})_C} \times 100$$

T = cultures traitées

C = cultures témoins

2. Ainsi, un RI de 53 % signifie que, par rapport au nombre de cellules ayant effectué une division cellulaire pour former des cellules binucléées et multinucléées dans la culture témoin, 53 % seulement de ces cellules ont effectué une division dans la culture traitée, soit une cytostase de 47 %.

3. En l'absence d'utilisation de cytoB, l'évaluation de la cytotoxicité sur la base de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou du doublement relatif de la population (RPD) est recommandée (58), ces deux mesures tenant compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées}(\text{final} - \text{initial}))}{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures témoins}(\text{final} - \text{initial}))} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures traitées})}{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures témoins})} \times 100$$

où:

$$\text{Doublement de population} = [\log (\text{nombre de cellules postapplication} \div \text{nombre de cellules initial})] \div \log 2$$

4. Ainsi, un RICC ou un RDP de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 %.

5. En utilisant l'Indice de prolifération (PI), la cytotoxicité peut être évaluée via le comptage du nombre de clones composés de 1 cellule (cl1), 2 cellules (cl2), 3 à 4 cellules (cl4) et 5 à 8 cellules (cl8)

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

6. Le PI est également un paramètre fiable et utile de cytotoxicité pour les lignées cellulaires cultivées in situ en l'absence de cytoB (25) (26) (27) (28).

Appendice 3

Produits chimiques de référence recommandés pour évaluer l'efficacité ⁽¹⁾

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS	N° CE
1. Clastogènes actifs sans activation métabolique			
	Cytosine arabinoside	147-94-4	205-705-9
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique			
	Benzo(a)pyrène	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
3. Aneugènes			
	Colchicine	64-86-8	200-598-5
	Vinblastine	143-67-9	205-606-0
4. Témoins négatifs			
	Di(2-éthylhexyl)phthalate	117-81-7	204-211-0
	Acide nalidixique	389-08-2	206-864-7
	Pyrène	129-00-0	204-927-3
	Chlorure de sodium	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Ces produits chimiques de référence sont ceux dont l'utilisation est recommandée. La substitution ou l'ajout de produits chimiques à cette liste de référence est possible si l'activité des produits en question est connue, s'ils induisent la formation de micronoyaux via les mêmes mécanismes d'action, et si leur pertinence est prouvée pour les substances d'essai dans le cadre de la procédure MNvit. Suivant l'objectif visé, la justification pourra aussi inclure une étude de validation couvrant une grande diversité de substances ou axée sur un spectre plus étroit, limité à la classe chimique de la substance d'essai ou au mécanisme de lésion examiné.

B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne 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 méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE), a 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 un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application lorsque 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 pour 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 méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (14). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE) et ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE), sont toutes plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et la LD 406 de l'OCDE (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 (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 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 (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (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 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 chimiques 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 (B.6, LD 406 de l'OCDE), 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 du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE (51), 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 au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (14), certaines limites peuvent imposer de privilégier le chapitre B.6 ou la LD 406 de l'OCDE [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai.] De surcroît, certaines substances chimiques 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 (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) 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 LA MÉTHODE D'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 procédures 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 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. 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'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 d'essai 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 interlaboratoires. 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 TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde 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 ≤ 6 mois) du 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 le témoin positif soit testé 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 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 appartenant à une classe chimique particulière, ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances 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 substance. 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 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 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 détecter 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 ≥ 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, pilo-érection, 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 Pétri 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 la mise à mort 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 30).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine 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 (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 William 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 et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

- données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, 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'un mélange: 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 contrôle 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 de la mise à mort 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 (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 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., Vandebruiel, R.J. et 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.
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].
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/LLNAPRRept2009.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 n° 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., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising 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^e 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/LLNAPerfStd.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 sensitisation 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 sensitisation 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].
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>]
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 sensitisation 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>]

Appendice 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.

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.

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 intralaboratoire et interlaboratoires (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 interlaboratoires: 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 interlaboratoires 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 intralaboratoire: 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 (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

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 physico-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.

B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne 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 méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE) a été révisée (1) et chapitre B.42 de la présente annexe). 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: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée] constitue une variante non radioactive de la méthode d'essai ELGL, qui fait appel à la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 59-14-3) non radiomarquée dans un essai de type ELISA pour mesurer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: BrdU-ELISA a été validée, puis évaluée et recommandée par un groupe international d'experts indépendants, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de produits chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE) et ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE), sont plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et dans la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: BrdU-ELISA 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 contrepartie, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour repérer les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13).

DÉFINITIONS

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

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: BrdU-ELISA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances chimiques susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans un cadre précis. Cela n'implique pas que l'ELGL: BrdU-ELISA doive systématiquement remplacer l'ELGL classique ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), 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 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: BrdU-ELISA avec la substance d'essai considérée [étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: BrdU-ELISA (voir paragraphe 5)], et aider à choisir les doses appropriées.
5. La méthode ELGL: BrdU-ELISA, mise en œuvre *in vivo*, ne met donc pas un terme à l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (13). En outre, l'ELGL: BrdU-ELISA propose un raffinement important de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE, l'ELGL: BrdU-ELISA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL: BrdU-ELISA ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (chapitre B.6 de la présente annexe, 13). Cette méthode permet donc de réduire le stress des animaux. Malgré les avantages de l'ELGL: BrdU-ELISA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13), certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B.6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances chimiques comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (15) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: BrdU-ELISA (10). Dans ces limites, l'ELGL: BrdU-ELISA est applicable à tout produit chimique 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 1,6 et 1,9 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 43 substances présentant un $IS \geq 1,6$ (voir paragraphe 6), l'ELGL: BrdU-ELISA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour deux des 11 substances non sensibilisantes (d'après ELGL) présentant un indice de stimulation compris entre 1,6 et 1,9 (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 LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: BrdU-ELISA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération primaire 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 dans le groupe TV concurrent pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 1,6, on peut ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de la BrdU pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage. La BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore de la même manière dans l'ADN de cellules en prolifération. L'incorporation de la BrdU est quantifiée par ELISA, grâce à un anticorps spécifique de la BrdU marqué par la peroxydase. Cette enzyme réagit ensuite avec un substrat ajouté spécialement pour produire un composé coloré, dosé avec un lecteur de plaque de microtitrage à une absorbance donnée.

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: BrdU-ELISA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/JN, qui sera donc privilégiée pour cet essai (10) (12). 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. 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: BrdU-ELISA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (16), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. 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'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 chimiques 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 chimiques liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances chimiques 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 interlaboratoires. 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: BrdU-ELISA. 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: BrdU-ELISA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation supérieur d'au moins 1,6 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 > 14 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS 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 témoins positifs répondant aux critères susmentionnés pourront être employés, à condition que ce choix soit correctement justifié.
12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: BrdU-ELISA 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: BrdU-ELISA 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: BrdU-ELISA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou des réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis à contribution, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements seront 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 autre base de données afin d'évaluer la cohérence des nouveaux résultats relatives 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 du 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 (17).
15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive, 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'essai avec un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (18). Si le 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 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 composés. Les substances étalons adaptées 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: BrdU-ELISA,
 - 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 et un 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 19. Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriées telles 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 que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (19) (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). 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 doit être 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 propylèneglycol 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 d'essai 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 (17). Du reste, certaines autorités réglementaires 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: BrdU-ELISA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: BrdU-ELISA 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 les suspensions.
22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: BrdU-ELISA, 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 (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 (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). 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, au sixième 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 ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (21) (22). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: BrdU-ELISA 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 épaississement de l'oreille de 25 % (21) (22), 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 (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (25) (26) (27) (28) (29).
24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (30) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: BrdU-ELISA: 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 sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (31).

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 μ L 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 jour*: Aucun traitement.
- *Cinquième jour*: Injecter 0,5 mL (5 mg/souris) d'une solution de BrdU (10 mg/mL) par voie intrapéritonéale.

- *Sixième jour*: Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Euthanasier les animaux environ 24 heures (24 h) après l'injection de BrdU. 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 (17). 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, 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 (par exemple en broyant les ganglions dans un mortier en plastique jetable avant de les passer dans un tamis en nylon de 70 microns). La procédure de dispersion des CGL constitue une étape cruciale de l'essai, et est maîtrisée préalablement par chaque opérateur. En outre, les ganglions lymphatiques des animaux du groupe TN étant petits, il importe de les manipuler avec précaution afin d'éviter toute perturbation des valeurs IS. Dans chaque cas, le volume de suspension de CGL visé correspond à un volume optimisé préétabli (environ 15 mL). Le volume optimisé est celui pour lequel l'absorbance moyenne du groupe TN se situe entre 0,1 et 0,2.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de la BrdU dans l'ADN des lymphocytes)

27. La BrdU est quantifié à l'aide d'un kit de dosage ELISA commercial (par exemple Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne, référence 11 647 229 001). Placer rapidement 100 µL de suspension de CGL dans les puits d'une microplaque à fond plat, en triplicats. Après fixation et dénaturation des CGL, ajouter les anticorps anti-BrdU dans chaque puits et laisser réagir. Éliminer ensuite les anticorps anti-BrdU par lavage, puis ajouter la solution de substrat et laisser le chromogène être synthétisé. Mesurer l'absorbance à 370 nm, pour une longueur d'onde de référence fixée à 492 nm. Dans tous les cas, il convient d'optimiser les conditions de l'essai (voir paragraphe 26).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine 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 excessive ou de corrosion locale de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (31).

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 l'indice de marquage BrdU moyen de chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par l'indice de marquage BrdU moyen du groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

L'indice de marquage BrdU est calculé comme suit:

$$\text{Indice de marquage BrdU} = (\text{ABSem} - \text{ABS blancem}) - (\text{ABSréf} - \text{ABS blancréf})$$

Où em = longueur d'onde d'émission et réf = longueur d'onde de référence.

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque $IS \geq 1,6$ (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 1,6 et 1,9) est jugé positif (3) (6) (32).
32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,6 et 1,9), 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 William 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 indices de marquage BrdU pour chaque animal, la moyenne des indices de marquage BrdU/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 et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

- données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, 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'un mélange: 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 et données du fabricant en matière d'assurance et de contrôle qualité (sensibilité et spécificité des anticorps, limites de détection) pour le kit ELISA,
- 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 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.

Résultats:

- 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 sur le site d'administration, pour chaque animal,
- tableau des indices de marquage BrdU et IS par souris pour chaque groupe de traitement,
- moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des indices de marquage BrdU par 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 (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 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, 327-33.
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 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.

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]
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. Biochem. Pharmacol.*, 34, 3-258.
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(3), 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(3), 249- 257.
10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA), NIH Publication No. 10-7552A/B, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/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]
12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. et Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay, *j. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
13. OCDE (1992), *Sensibilisation de la peau*, Ligne directrice n° 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. 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.
15. 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.
16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
17. 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]
18. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
19. 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.
20. OCDE (2002), *Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Ligne directrice n° 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>]
21. 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.
22. 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>].

23. 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.
24. 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.
25. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
26. 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.
27. 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.
28. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
29. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
30. 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].
31. 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>]
32. 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.
33. 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 No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices>]

Appendice 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 d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (33).

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 (33).

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 intralaboratoire et interlaboratoires (33).

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 (33).

Reproductibilité interlaboratoires: 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 interlaboratoires 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 (33).

Reproductibilité intralaboratoire: 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 (33).

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, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

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.»
