

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

### **Toxicité Cutanée Aiguë : Méthode de la Dose Prédéterminée**

#### **INTRODUCTION**

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement révisées pour tenir compte des progrès scientifiques et des considérations relatives au bien-être animal. Une première LD 402 sur la toxicité cutanée aiguë a été adoptée en 1987. Plusieurs publications récentes ont analysé les résultats des études de toxicité orale et cutanée aiguë portant sur des centaines de substances actives de pesticides et sur des milliers de produits chimiques utilisés dans l'industrie. Leur conclusion était que, dans plus de 98 % des cas, les classifications réglementaires fondées sur les données de toxicité orale aiguë étaient aussi astreignantes ou plus astreignantes que les classifications fondées sur les données de toxicité cutanée. Ce résultat remet en question la pertinence des essais en routine à des fins réglementaires (1-6). Dans le document d'orientation n°237 de l'OCDE sur le renoncement aux essais ou le recouplement des essais de toxicité aiguë sur les mammifères (7), des critères permettant de lever l'obligation d'études de toxicité cutanée aiguë sont énoncés. Ces critères doivent être pris en compte avant de décider de la conduite d'une étude, dans le but de ne recourir aux essais sur les animaux pour ce danger que dans des circonstances exceptionnelles dûment justifiées scientifiquement. Le présent document concerne le recours aux essais de toxicité aiguë dans l'évaluation du danger pour la santé humaine. Si les résultats doivent aussi être utilisés dans d'autres domaines tels que l'évaluation du risque environnemental, l'organisation de l'étude doit faire l'objet d'une attention particulière.

2. Suite aux recommandations de plusieurs réunions d'experts, un accord international sur les valeurs limites harmonisées des  $DL_{50}$  pour la classification des produits chimiques avait été conclu. Il semblait opportun de réviser la LD 402, car i) l'essai sur des animaux d'un seul sexe (généralement des femelles) est désormais jugé suffisant dans la plupart des cas et, ii) pour que l'estimation d'une valeur ponctuelle soit significative, il est nécessaire d'évaluer les intervalles de confiance (8) (13). Définir des doses suffisamment distinctes permet de classer un produit chimique d'essai en fonction de son niveau de danger conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage (SGH), pour des produits pour lesquels aucune estimation de valeur ponctuelle de toxicité n'est disponible (10).

3. Une analyse biométrique a permis d'évaluer et de comparer le niveau de performance de plusieurs méthodes d'essai sur la toxicité cutanée aiguë, dans le but de retenir la meilleure méthode d'essai dans la LD 402 mise à jour (11). Des évaluations biométriques de la méthode employée dans la version originale de la LD 402, datant de 1987, ont été menées et quatre modifications à la méthode de la dose prédéterminée (12), ainsi qu'une méthode par classe de toxicité aiguë (9) et une méthode d'ajustement des doses (13) modifiées, ont été proposées. Si, en dehors de la méthode d'ajustement des doses, la LD 402 originale était la plus performante pour classer correctement les produits chimiques par niveau de danger, la méthode cutanée de la dose prédéterminée a surpassé toutes les autres méthodes dans le classement sûr des produits chimiques. En outre, la méthode cutanée de la dose prédéterminée repose sur l'utilisation d'un moindre nombre d'animaux comparée à la LD 402 originale ou à la méthode d'ajustement des doses. Pour ces raisons, la procédure séquentielle de la Ligne directrice 402 de l'OCDE, qui utilise jusqu'à trois animaux d'un même sexe par étape, a été modifiée sur la base de la méthode de la classe de toxicité aiguë et de la méthode de la dose prédéterminée de la Ligne directrice 420 de l'OCDE (12). En fonction du taux de mortalité ou de l'état moribond des animaux, des étapes supplémentaires peuvent être requises pour juger de la toxicité aiguë du produit chimique d'essai. La méthode est reproductible, repose sur un nombre très réduit d'animaux et permet de classer les produits chimiques d'essai (14) de manière comparable à d'autres méthodes d'essai de toxicité aiguë (LD 425, par exemple (13)).

4. On trouvera à l'Annexe 1 les définitions des termes utilisés dans la présente Ligne directrice.

#### REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Dans le souci de concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* de toxicité cutanée aiguë avant d'avoir évalué, par une analyse du poids de la preuve, toutes les données relatives au caractère potentiellement toxique pour la peau du produit chimique. Toutes les données disponibles relatives au produit chimique d'essai doivent être prises en compte avant de mener l'étude. Les données doivent comprendre l'identification et la structure chimique du produit chimique, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les essais de toxicité *in vitro* ou *in vivo* auxquels il a été soumis, les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées, son(s) utilisation(s) escomptée(s), les risques d'exposition humaine et l'utilisation escomptée des données générées. Ces informations aideront à justifier la conduite de l'étude et, si besoin, le choix de la dose initiale adaptée. La méthode repose sur le principe que seules des doses supposées modérément toxiques sont utilisées et qu'il convient d'éviter d'administrer une dose potentiellement mortelle.

6. On trouvera des recommandations sur les possibilités de renoncer à une étude selon cette méthode, dans un but donné, dans le document d'orientation sur le renoncement aux essais ou le recoupement des essais de toxicité aiguë sur les mammifères (7). La possibilité de renoncer à cette étude doit s'appuyer sur les exigences réglementaires applicables en matière d'information.

7. L'attention est principalement portée sur l'estimation des plages de toxicité pertinentes, cependant les données générées peuvent servir à classer le produit chimique conformément aux critères de classification et d'étiquetage (10). Les données générées dans des essais de toxicité aiguë sont particulièrement importantes pour évaluer les dangers potentiels en cas d'accidents. Cependant, bien souvent, les données requises dans ces circonstances dépassent le cadre d'une étude de toxicité aiguë. S'il n'est pas scientifiquement justifié de renoncer à l'essai (7), un essai *in vivo* de toxicité cutanée aiguë peut

être mené au cas par cas, à condition qu'une justification claire de la valeur et de la pertinence des données générées soit fournie.

8. Les produits chimiques d'essai ne doivent pas être administrés à des doses connues pour provoquer une douleur importante ou une détresse par un mécanisme potentiellement corrosif ou fortement irritant. Le pH et le pouvoir tampon du produit chimique d'essai donnent des indications utiles en ce sens. Un essai *in vitro* peut être mené pour vérifier le potentiel corrosif du produit chimique d'essai. Au cours de l'essai, on doit euthanasier avec humanité les animaux moribonds et les animaux qui souffrent de façon manifeste ou qui montrent des signes de détresse grave. Ces animaux doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider d'euthanasier les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (15).

9. Si l'étude est menée, les effets locaux et systémiques doivent être évalués. Une preuve claire d'irritation cutanée (niveau 3 ou 4 d'érythème et/ou niveau 3 ou 4 d'œdème, par exemple) dans l'étude cutanée peut renseigner sur le potentiel d'irritation sans que soit menée une étude d'irritation spécifique.

#### ***Mélanges et produits formulés***

10. Une évaluation approfondie des produits en mélange (y compris pesticides, biocides et autres produits formulés) (16) a démontré que leur toxicité cutanée aiguë est rarement supérieure à la toxicité orale aiguë du même mélange. De fait, dans la majorité des cas (99 %), la DL<sub>50</sub> cutanée est  $\geq 2000$  mg/kg-poids corporel. En conséquence, il est recommandé d'appliquer les critères de renoncement à l'étude pour les données de toxicité orale aiguë (si la DL<sub>50</sub> orale est  $> 2000$  mg/kg-poids corporel), afin d'éviter les essais non nécessaires. De plus, les données *in vivo* ont été comparées à la méthode de calcul du SGH, voir Chapitre 3.1.3 Critères de classification pour les mélanges (10), dans lequel sont calculées les catégories de classification fondées sur l'estimation de toxicité aiguë pour chacun des composants du mélange. Ces données présentent une concordance  $> 98$  % (sans sous-prédiction, c'est-à-dire sans faux négatifs) et constituent donc une autre justification pour renoncer à l'essai cutané. De manière générale, aucun effet de synergie entre les composants d'un mélange n'est attendu, cependant il convient de prendre en compte les éventuelles interactions qui peuvent contribuer au potentiel de toxicité du mélange final.

#### **PRINCIPE DE L'ESSAI *IN VIVO***

11. Des cohortes d'animaux du même sexe sont exposées au produit chimique d'essai dans une procédure séquentielle, avec les doses prédéterminées adaptées telles que définies à l'Annexe 2. En fonction des preuves disponibles pour le produit chimique d'essai, un essai de détermination de la plage de doses adaptées peut être nécessaire (lorsque les informations sont lacunaires ou absentes, par exemple). La dose initiale est choisie pour que des signes clairs de toxicité soient attendus avec cette concentration, mais pas d'effets toxiques graves ni de mortalité. D'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou moins fortes en fonction de l'absence ou de la présence d'effets toxiques ou de mortalité. On continue la procédure jusqu'à ce que l'on identifie la dose qui occasionne un effet toxique ou la mort d'un seul animal. La procédure est également interrompue lorsque la dose la plus forte ne donne lieu à aucun effet observé ou que la dose la plus faible provoque la mort d'un animal.

12. Le produit chimique d'essai est appliqué sur la peau à doses incrémentales, à plusieurs groupes d'une dose par groupe. Ensuite on observe les effets et on enregistre le taux de mortalité. Les animaux qui meurent au cours de l'expérience sont autopsiés ; ceux qui restent en vie à l'issue de celle-ci sont sacrifiés et autopsiés.

13. En s'appuyant sur les résultats observés, on détermine alors la classification du produit chimique d'essai.

## **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

### **Choix de l'espèce animale**

14. Le modèle de choix est le rat adulte. Concernant le sexe le plus approprié, l'analyse des essais conventionnels de toxicité orale aiguë (17) et de toxicité aiguë par inhalation (18) (19) permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont généralement légèrement plus sensibles. De plus, une récente analyse des données de toxicité cutanée générées pour un large éventail de produits (16) a apporté des preuves supplémentaires et confirmé l'absence de différence de résultats selon le sexe. Il est donc recommandé de travailler sur des femelles. Cependant, si la connaissance des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de produits chimiques structurellement apparentés indique que les mâles sont susceptibles d'être plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Lorsque l'essai est mené sur des mâles, une justification suffisante devra être fournie dans le rapport final.

15. On prendra des animaux adultes sains provenant de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Lors de l'application de la première dose, chaque animal doit être un jeune adulte (âgé d'au moins 8-10 semaines), d'une taille facilitant l'essai (200-300 g) et d'un poids de  $\pm 20\%$  le poids moyen des animaux utilisés précédemment. Il faut des animaux à peau saine et intacte.

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

16. La température de l'animalerie d'expérimentation doit être de  $22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Idéalement, le taux d'humidité relative devrait se situer entre 50 et 60 pour cent, et doit atteindre au moins 30 pour cent et ne pas dépasser 70 pour cent, de préférence, sauf pendant le nettoyage du local. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété.

### **Préparation des animaux**

17. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, les animaux sont conservés pendant au minimum cinq jours avant le début de l'essai, dans des cages communes pour garantir leur bien-être. Sélectionnés au hasard, les animaux utilisés sont marqués pour être identifiés individuellement.

18. La veille de l'administration du produit chimique, l'animal est tondu de près sur le dos et le flanc (soit au moins 10 % de la surface totale du corps). Afin de faciliter les manipulations et de réduire le stress pour l'animal, celui-ci peut être anesthésié. Cette opération doit s'effectuer en évitant toute lésion de la peau

qui pourrait entraîner une modification de sa perméabilité. Le poids de l'animal doit être pris en compte dans l'évaluation de la zone à dégager et de la surface à enduire.

## **MODE OPÉRATOIRE**

### **Administration des doses**

19. Le produit chimique d'essai est appliqué de façon aussi uniforme que possible sur la surface de peau exposée du dos/du flanc (soit sur au moins 10 % de la surface totale du corps). Dans le cas de produits chimiques d'essai fortement toxiques, la superficie couverte peut être moindre mais la pellicule de produit appliquée doit être aussi mince et aussi uniforme possible, et couvrir autant que possible la zone dégagée. Les produits chimiques d'essai doivent être maintenus en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant pendant une période d'exposition de 24 heures. Le site traité doit être ensuite couvert de manière à maintenir le pansement de gaze et le produit chimique, et à éviter que les animaux puissent ingérer le produit. Pour cela, des appareils de contention peuvent être employés, mais une immobilisation totale n'est pas recommandée. Pendant la période d'exposition de 24 heures, les animaux sont placés en cage individuelle pour éviter toute ingestion du produit chimique d'essai par d'autres animaux.

20. Si l'essai porte sur des solides qui peuvent être pulvérisés le cas échéant, le produit chimique d'essai sera humidifié au moyen d'eau ou, au besoin, au moyen d'un véhicule approprié de façon à garantir un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un véhicule (en dehors de l'eau), son influence sur la pénétration du produit chimique d'essai dans la peau doit être prise en considération. Le volume de véhicule utilisé est enregistré (en général, 0,5-1 mL suffit). Les produits chimiques d'essai liquides ne sont en général pas dilués avant application.

21. À la fin de la période d'exposition, tout résidu du produit chimique d'essai doit être éliminé en utilisant de préférence de l'eau ou un solvant approprié. Les animaux retournent en cages communes, sauf s'il est jugé nécessaire de les placer en cages individuelles (s'il existe un risque que le contact avec d'autres animaux puisse accroître le stress à cause de la nature ou de la gravité des signes de toxicité, ou puisse aggraver les effets cutanés locaux du produit, par exemple). Cependant, on veillera à limiter au strict minimum le temps passé en cage individuelle.

### **Nombre d'animaux et niveaux des doses**

22. Dans l'essai principal, le produit chimique d'essai est appliqué aux animaux de manière séquentielle, deux par deux pour chaque dose. En général, si un essai de toxicité cutanée aiguë est mené car les critères de renoncement n'étaient pas remplis, la toxicité cutanée aiguë attendue est inconnue ou élevée (par exemple,  $DL_{50} < 200$  mg/kg-poids corporel).

23. Si les informations disponibles pour un produit chimique d'essai sont lacunaires ou absentes, un essai de détermination de la plage de doses adaptées est mené sur un animal, avec une dose initiale recommandée de 200 mg/kg-poids corporel, pour réduire au minimum l'utilisation d'animaux et optimiser l'essai (voir Annexe 2 pour le diagramme de flux de l'essai de détermination de la plage). En s'appuyant sur les résultats de l'essai de détermination de la plage, l'essai principal peut être mené avec deux animaux

supplémentaires pour confirmer la classification, en suivant la procédure du diagramme de flux pour l'essai principal à l'Annexe 2. Cette approche est renforcée par une évaluation biométrique (11) qui a été menée pour comparer plusieurs protocoles d'étude et les prédictions de classification qu'ils ont générées. Cela renforce la confiance dans le protocole d'étude recommandé, dans lequel seuls deux animaux sont nécessaires pour obtenir une classification exacte lors de l'essai principal.

24. Si des informations sont disponibles concernant le produit chimique d'essai mais qu'il n'est pas possible de renoncer à l'essai, une autre dose initiale peut être choisie, par exemple 50, 1000 ou 2000 mg/kg-poids corporel (proche de la dose limite), en suivant la même procédure (essai de détermination de la plage puis essai principal) conformément aux catégories de toxicité cutanée aiguë du SGH (10).

25. Un intervalle d'au moins 48 heures est observé entre deux essais sur chaque animal, cependant cette durée peut varier en fonction du moment de l'apparition des signes de toxicité, de leur durée et de leur gravité. Le traitement d'un autre animal à la dose suivante est retardé jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Tous les animaux sont observés pendant au minimum 14 jours.

## **OBSERVATIONS**

26. Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement. Une attention particulière s'impose pendant les premières 2 à 6 heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration. Cependant, la durée d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés (4). Toutes les observations sont consignées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés sans attendre. Quand les animaux sont euthanasiés pour des raisons humanitaires ou si on les trouve morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

27. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. En outre, la zone traitée doit être observée 24, 48 et 72 heures après le rinçage du produit chimique suivant les critères du test de Draize, car ces données peuvent servir à justifier un renoncement à un essai d'irritation cutanée *in vivo* séparé.

### **Poids corporel**

28. Le poids de chaque animal est vérifié le jour de l'essai ou immédiatement avant l'application du produit chimique d'essai, et au moins une fois par semaine après l'application. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés, puis sacrifiés.

### **Pathologie**

29. Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude et euthanasiés pour des raisons de bien-être animal) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie, ou de la zone traitée, doit également être envisagé, car cet examen peut fournir des renseignements utiles.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Résultats**

30. Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant pour chaque groupe d'essai le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou euthanasiés pour des raisons humanitaires, pour chaque animal le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité et les résultats de l'autopsie.

31. Comme précisé à l'Annexe 2, la catégorie de classification du produit chimique d'essai doit être déterminée. Les étapes à prévoir après l'essai avec la dose initiale sont indiquées dans le diagramme de flux. Sur la base de l'étude de détermination de la plage, une des trois étapes suivantes est appliquée pour l'essai principal : 1) essai avec la même dose pour confirmer les résultats, 2) essai avec une dose plus élevée ou 3) essai avec une dose moins élevée. Si, dans l'étude de détermination de la plage, une dose est mortelle, elle n'est pas utilisée dans l'essai principal pour épargner des souffrances inutiles aux animaux. Les résultats de l'essai principal avec deux animaux supplémentaires par dose confirmeront la bonne classification de danger sans que d'autres essais soient nécessaires.

### **Rapport d'essai**

32. Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants :

*Justification de l'essai in vivo : analyse de la valeur des résultats disponibles avant l'essai :*

- description des résultats pertinents d'essais précédents ;
- données obtenues à chaque étape de la stratégie d'essai ;
- analyse du poids de la preuve pour réaliser une étude *in vivo* ;

*Produit chimique d'essai*

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible ;
- stabilité du produit chimique testé lui-même, si elle est connue ;

- solubilité et stabilité du produit chimique dans le véhicule, si elles sont connues ;

*Substance mono-constituant :*

- apparence physique et autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude (par exemple, pouvoir tampon) ;

- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurelle,

- pureté,

- identité chimique des impuretés, s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

*Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :*

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

*Véhicule (s'il y a lieu) :*

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

*Animaux d'essai :*

- espèce/souche utilisées ;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu ;
- nombre, âge et sexe des animaux (la justification de l'utilisation de mâles à la place de femelles, le cas échéant) ;
- origine, conditions d'hébergement, alimentation, données historiques, etc. ;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance et celle de l'eau) ;
- méthode de randomisation pour le choix des animaux.

*Conditions de l'essai :*

- formulation détaillée du produit chimique d'essai, y compris l'état physique du produit administré ;
- détails de l'administration du produit chimique d'essai et de la zone traitée, y compris volume de la dose, zone d'application et durée d'exposition ;



- la justification du choix de la dose initiale ;

*Résultats :*

- tableau des résultats et niveau de dose pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de la mortalité, nature, gravité et durée des effets) ;
- tableau des poids corporels et changements de poids ;
- poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite par intervalles d'une semaine ; - date et heure de la mort si l'animal meurt avant l'euthanasie prévue ;
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité ;
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et toutes les observations histopathologiques ;
- évaluation selon les critères de Draize, le cas échéant ;
- procédure d'interprétation des données

*Discussion et interprétation des résultats.*

*Conclusions.*

## BIBLIOGRAPHIE

1. Thomas, H.D. and Dewhurst, I.C. (2007). What does a dermal acute toxicity study add to the information on a plant protection pesticide? *Toxicol.* **231**, 114-15.
2. Creton, S., Dewhurst, I.C., Earl, L.K. *et al.* (2010). Acute toxicity testing of chemicals—Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* **40**, 50-83.
3. Seidle, T., Prieto, P. and Bulgheroni, A. (2011). Examining the regulatory value of multi-route mammalian acute systemic toxicity studies. *ALTEX* **28**, 95-102.
4. Indans, I., Fry, T., Parsons, P., *et al.* (1998). Classification and labelling of new industrial chemicals for acute toxicity, skin and eye irritation. *Hum. Exp. Toxicol.* **17**, 529.
5. Seidle, T., Robinson, S., Holmes, T. *et al.* (2010). Cross-Sector Review of Drivers and Available 3Rs Approaches for Acute Systemic Toxicity Testing. *Tox. Sci.* **116**, 382-96.
6. Moore, N.P., Andrew, D.J., Bjerke, D. L. *et al.* (2013). Can acute dermal systemic toxicity tests be replaced with oral tests? A comparison of route-specific systemic toxicity and hazard classifications under the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **66**, 30–37.
7. OCDE (2016), Guidance Document on Waiving or Bridging of Mammalian Acute Toxicity Tests. Draft dated January 2016. Series on Testing and Assessment No.237, Publications de l'OCDE sur l'hygiène et de la sécurité de l'environnement, OCDE, Paris.
8. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report : a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.* **3**, 85-92.
9. OCDE (2002), *Essai n° 423 : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë*, Éditions OCDE, Paris.
10. ONU (2015), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Cinquième édition révisée, ONU New York et Genève, voir : [http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_f.html](http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html).
11. Mielke H., Strickland J., Jacobs M.N., Mehta J.M. (2017) Biometrical Evaluation of the Performance of the Revised Test Guideline 402 for Assessing Acute Dermal Toxicity. *In press*. Regulatory Toxicology and Pharmacology.
12. OCDE (2002), *Essai n° 420 : Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée*, Éditions OCDE, Paris, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070950-fr>.
13. OCDE (2008). *Essai n° 425 : Toxicité aiguë par voie orale : méthode de l'ajustement des doses*, Éditions OCDE, Paris, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071056-fr>
14. Stallard, N., Whitehead, A. and Indans, I. (2004). Statistical Modelling and Evaluation of an Acute Dermal Toxicity Test Using Dermal Fixed Dose Procedure. *Hum. Exp. Toxicol.* **23**(8), 405-12.

15. OCDE (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications de l'OCDE sur l'hygiène et de la sécurité de l'environnement, Series on Testing and Assessment, n° 19, OCDE, Paris.
16. Corvaro, M., Gehen, S., Andrews, K. *et al.*, (2016). GHS Additivity Formula : A true replacement method for acute systemic toxicity of agrochemical formulations. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **82** : 99-110 (available online, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.007>).
17. Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. N. *et al.* (1995). Comparison of the Up-and- Down, Conventional LD50 and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* **33**, 223-231.
18. Warbrick, E. V., Indans, I., Blackwell, M. *et al.* (2002). The reduction and refinement of animal use in acute inhalation toxicity testing. *Toxicol.* **192**, 92.
19. Price, Ch., Stallard, N., Creton, S. *et al.* (2010). A statistical evaluation of the effects of gender differences in assessment of acute inhalation toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **30**(3), 217–238.

ANNEXE 1**DÉFINITIONS**

**DL<sub>50</sub> (dose létale médiane)** : dose unique d'un produit chimique d'essai obtenue par calcul statistique, supposée entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par une voie donnée. La DL<sub>50</sub> s'exprime en poids du produit chimique d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (mg/kg-pc).

**Dose** : Quantité de produit chimique d'essai administrée, exprimée en poids par unité de poids de l'animal soumis à l'essai (mg/kg-poids corporel, par exemple)

**Dose limite** : Une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2000 mg/kg-pc).

**État moribond** : L'état avant la mort ou l'incapacité de survivre, même si un traitement est donné. (Pour plus d'informations, consulter le document d'orientation n°19 sur les points limites en expérimentation animale (14)).

**Mort imminente** : qualifie une situation où l'on s'attend à ce qu'un animal devienne moribond ou meure avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements. (Pour plus d'informations, consulter le document d'orientation n°19 sur les points limites en expérimentation animale (14)).

**Mort prévisible** : la présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment futur connu avant la fin projetée de l'expérience, par exemple l'incapacité d'atteindre l'eau ou la nourriture. (Pour plus d'informations, consulter le document d'orientation n°19 sur les points limites en expérimentation animale (14))

**Produit chimique d'essai** : désigne le produit chimique testé.

**SGH** : Système de classification globalement harmonisé. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du Comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du B.I.T (communication des dangers) et coordonnée par IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

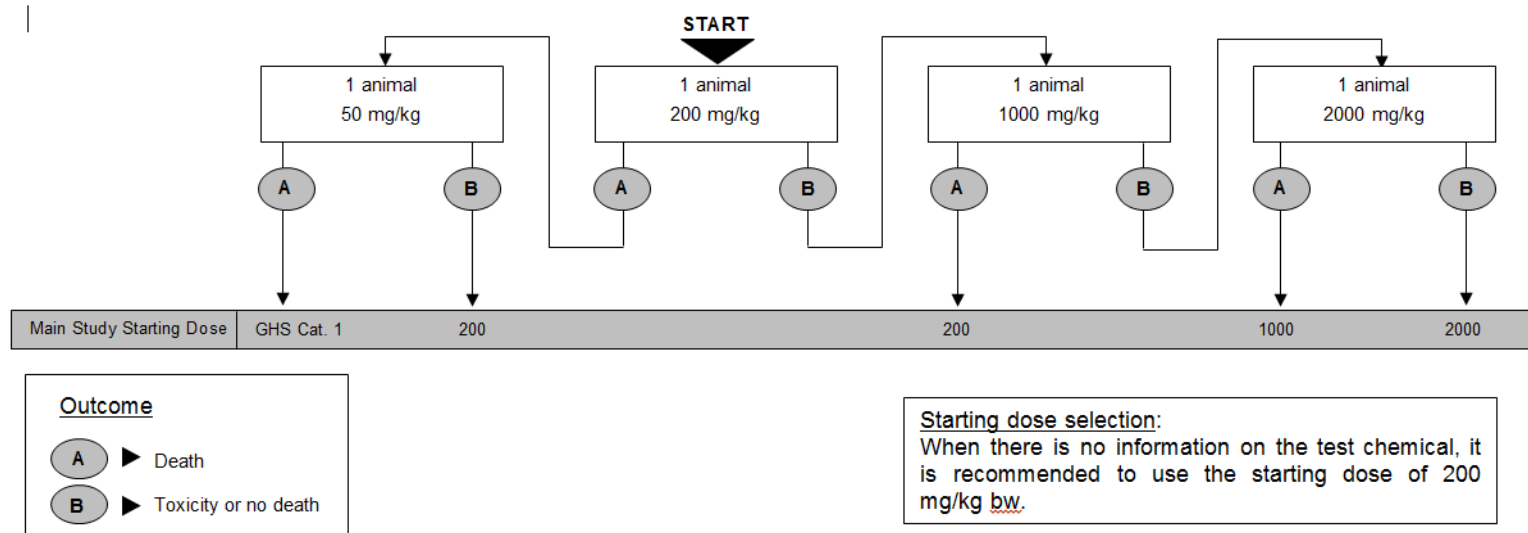
**Toxicité cutanée aiguë** : L'effet néfaste qui se produit dans un court laps de temps (moins de 24 heures) après l'application cutanée ininterrompue d'une dose unique d'un produit chimique d'essai.

**UVCB** : Substance de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

ANNEXE 2

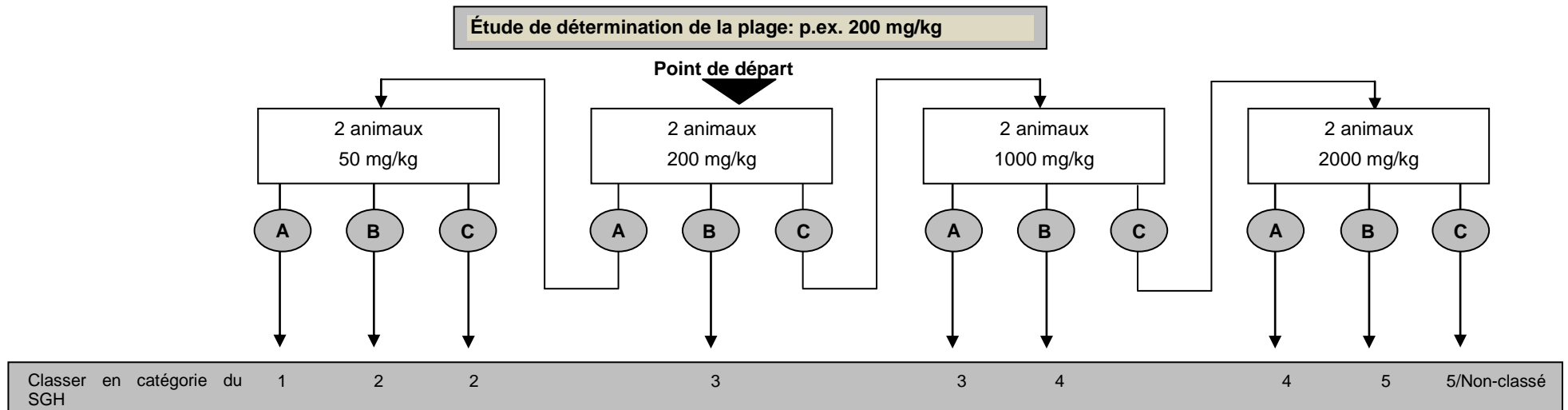
DIAGRAMMES DE FLUX DE LA PROCÉDURE D'ESSAI

Étude de détermination de la plage



Point de départ / 1 animal/ Dose initiale dans l'essai principal / SGH Cat. 1 / Résultat (A) Mort (B) Toxicité ou survie / Choix de la dose initiale : en l'absence d'informations sur le produit chimique d'essai, la dose recommandée est 200 mg/kg-pc.

Essai principal



**Résultat**

- A** ► 2 morts
- B** ► 1 mort
- C** ► Pas de toxicité visible ni mort

