

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

Absorption cutanée : méthode *in vivo*

INTRODUCTION

1. Dans le cas de nombreux produits chimiques, l'exposition survient généralement de manière transcutanée, c'est-à-dire *via* la peau. Or, la majorité des études toxicologiques réalisées sur des animaux en laboratoires s'appuient sur une administration par voie orale des produits. L'étude d'absorption cutanée *in vivo* décrite dans cette Ligne directrice offre donc les éléments nécessaires pour extrapoler les résultats des études avec administration par voie orale, lors des évaluations en matière de sécurité suite à une exposition cutanée.

2. Avant de passer dans la circulation, une substance doit d'abord traverser un grand nombre de couches cellulaires de la peau. Pour la plupart des substances, c'est le *stratum corneum*, composé de cellules mortes, qui est la couche déterminante sur le plan cinétique. La perméabilité de la peau dépend à la fois de la lipophilicité de la substance et de l'épaisseur de la couche externe de l'épiderme, ainsi que d'autres facteurs tels que le poids moléculaire et la concentration de la substance. De manière générale, la peau des rats et des lapins est plus perméable que celle de l'homme, tandis que celle des cobayes, des porcs et des singes se rapproche de la peau humaine.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

3. Les méthodes de mesure de l'absorption percutanée se divisent en deux catégories: *in vivo* et *in vitro*. La méthode *in vivo* fournit de bonnes informations sur l'absorption cutanée sur différentes espèces de laboratoire. Mises au point plus récemment, les méthodes *in vitro* se fondent sur le transport d'une substance à travers tout ou partie de l'épaisseur de la peau humaine ou animale jusqu'à un réservoir de fluide. La méthode *in vitro* est décrite dans une autre Ligne directrice de l'OCDE (1). Pour choisir la méthode la mieux appropriée en fonction des situations données, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) qui examine en détails la pertinence respective des méthodes *in vivo* et *in vitro*.

4. La méthode *in vivo* décrite dans la présente Ligne directrice permet de déterminer que la substance d'essai a traversé la peau pour pénétrer dans le compartiment systémique. La technique est largement utilisée depuis de nombreuses années (3)(4)(5)(6)(7). Alors que les études *in vitro* d'absorption percutanée conviennent dans de nombreux cas, il existe certaines situations dans lesquelles seule une étude *in vivo* permet d'obtenir les données voulues.

5. Les avantages de la méthode *in vivo* sont les suivants : utilisation d'un système intact sur le plan physiologique et métabolique, utilisation d'une espèce commune à bon nombre d'études de toxicité, et possibilité de modification pour une utilisation sur d'autres espèces. En revanche, elle présente certains inconvénients : utilisation d'animaux vivants, utilisation de matière radiomarquée pour garantir la fiabilité des résultats, difficultés à déterminer la phase d'absorption précoce, et différences de perméabilité entre la peau humaine et celle des espèces les plus communément utilisées (rat). En effet, la peau animale est généralement plus perméable, ce qui peut conduire à une surestimation de l'absorption percutanée chez

l'homme (6)(8)(9). Les substances caustiques et corrosives ne doivent pas être testées sur des animaux vivants.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. La substance d'essai, de préférence radiomarquée, est appliquée sur la peau rasée des animaux, à la dose ou aux différentes doses appropriée(s), sous la forme d'une préparation d'usage représentative. La préparation d'essai est maintenue au contact de la peau pendant une période donnée, sous un timbre adapté (non occlusif, semi-occlusif ou occlusif) de façon à prévenir l'ingestion de la préparation. Au terme de la période d'exposition, le timbre est retiré et la peau est nettoyée à l'aide d'un agent lavant approprié. Le timbre et le matériel utilisés pour appliquer l'agent lavant sont conservés pour analyse, et un timbre neuf est posé. Avant, pendant et après la période d'exposition, les animaux sont hébergés dans des cages métaboliques individuelles, et les excréments et l'air expiré au cours de ces périodes sont collectés pour analyse. Le cas échéant, si l'on dispose d'une information suffisante confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, la collecte de l'air expiré peut être omise. Normalement, chaque étude porte sur plusieurs groupes d'animaux exposés à la préparation d'essai. Un groupe est euthanasié à la fin de la période d'exposition, et les autres groupes sont euthanasiés par la suite à des intervalles déterminés (2). A la fin de la période d'échantillonnage, les animaux restants sont euthanasiés, le sang est collecté pour analyse, la zone d'application est prélevée pour analyse, et la carcasse est analysée pour rechercher toute matière non excrétée. Les échantillons sont analysés selon les méthodes appropriées et on estime le degré d'absorption percutanée (6)(8)(9).

MODE OPÉRATOIRE

Sélection de l'espèce animale

7. Le rat est l'espèce la plus communément utilisée, mais des souches et espèces sans poils présentant un taux d'absorption cutanée plus proche de celui de l'homme peuvent aussi être utilisées (3)(6)(7)(8)(9). Des jeunes adultes sains du même sexe (mâles par défaut) d'une souche communément utilisée en laboratoire sont utilisés. Au début de l'étude, les animaux retenus ne doivent pas présenter un écart de poids de ± 20 pour cent par rapport au poids moyen. Par exemple, des rats mâles de 200 à 250 grammes conviennent tout à fait, en particulier ceux présentant un poids dans la moitié supérieure de cette plage.

Nombre et sexe des animaux

8. Un groupe d'au moins quatre animaux du même sexe doit être utilisé pour chaque préparation d'essai et chaque durée programmée. Chacun des groupes est euthanasié à un intervalle de temps différent, par exemple à la fin de la période d'exposition (généralement de 6 à 24 heures) et à différentes échéances suivantes (48 et 72 heures par exemple). Dans le cas où des données disponibles démontrent une différence importante de sensibilité toxicologique dermique entre les mâles et les femelles, c'est le sexe le plus sensible qu'il convient d'utiliser. En l'absence de telles données, l'un ou l'autre des sexes peut être utilisé.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

9. La température du local expérimental doit être de 22 °C (± 3 °C). Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent sans excéder de préférence 70 pour cent, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforce de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On applique un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux sont nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire disponible à volonté et boivent de l'eau potable à volonté. Pendant l'étude, et de préférence également pendant la phase d'acclimatation, les animaux sont

placés dans des cages métaboliques individuelles. Les déversements d'eau ou de nourriture étant susceptibles de compromettre les résultats de l'étude, les risques de tels incidents doivent être minimisés.

Préparation des animaux

10. Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle, et placés dans leurs cages cinq jours au moins avant le début de l'essai, pour qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

11. A l'issue de la période d'acclimatation (et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai), la région dorsale des épaules de chaque animal est tondu à ras. La perméabilité d'une peau endommagée étant différente de celle d'une peau saine, un soin tout particulier doit être apporté pour ne pas « égratigner » la peau. Après la tonte (et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai sur la peau, voir paragraphe 14), la surface de la peau est délicatement nettoyée à l'acétone pour retirer le sébum. Il n'est pas recommandé de procéder à un nettoyage supplémentaire à l'eau et au savon dans la mesure où les résidus de savon sont susceptibles de favoriser l'absorption de la substance d'essai. La surface tondu doit être suffisamment grande pour permettre un calcul fiable de la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau, soit de préférence au moins 10 centimètres carrés. Des rats de 200 à 250 grammes sont compatibles avec une telle surface. Après préparation, les animaux sont replacés dans leurs cages métaboliques.

Substance d'essai

12. La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

Préparation de l'essai

13. La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation « d'usage » doit être justifiée. Le cas échéant, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adapté. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé, ses caractéristiques d'absorption et son interaction potentielle avec la substance d'essai doivent être connues.

Application sur la peau

14. Un endroit (« site ») d'application d'une superficie spécifique est défini sur la surface de la peau. Une quantité connue de la préparation d'essai est ensuite uniformément appliquée sur ce site. Normalement, cette quantité doit correspondre à une exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm² pour une substance solide ou jusqu'à 10 µl/cm² pour les liquides. L'application de toute autre quantité doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Après l'application, le site doit être protégé contre les frottements. La Figure 1 présente un exemple de dispositif classiquement employé dans ce contexte. Généralement, on protège le site d'application à l'aide d'un timbre/tampon non occlusif (par exemple, une compresse de gaze nylon perméable). Ceci dit, pour des applications infinies, le site d'application doit être recouvert d'un timbre occlusif. Dans les cas où l'évaporation d'une substance d'essai semi-volatile réduit dans une trop grande mesure le taux de récupération de la substance d'essai (voir également le paragraphe 20), il convient de piéger la substance évaporée dans un filtre à charbon monté sur le dispositif d'application (voir la Figure 1). Il est essentiel que les dispositifs d'application utilisés n'endommagent pas

la peau, et qu'ils n'absorbent pas non plus la préparation d'essai ni n'entrent pas en réaction avec elle. Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages métaboliques individuelles pour la collecte de leurs excréments.

Durée de l'exposition et échantillonnage

15. La durée de l'exposition correspond à l'intervalle de temps entre l'application de la préparation d'essai et son retrait par nettoyage de la peau. Une période d'exposition pertinente (généralement de 6 à 24 heures) doit être retenue, en fonction de la durée éventuelle de l'exposition humaine. A l'issue de la période d'exposition, les animaux sont maintenus dans leurs cages métaboliques jusqu'au terme prévu. Pendant toute la durée de l'étude, il convient d'observer les animaux à intervalles réguliers, pour détecter tout signe de toxicité ou toute réaction anormale. Après la période d'exposition, les éventuels signes visibles d'irritation doivent être observés sur la peau traitée.

16. Les cages métaboliques doivent permettre la collecte séparée des fèces et de l'urine pendant toute la durée de l'étude, ainsi que la collecte du dioxyde de carbone marquée au C^{14} et des composés volatils C^{14} qu'il convient d'analyser lorsqu'ils sont produits en quantité (>5 pour cent). L'urine, les fèces et autres fluides (par exemple, le dioxyde de carbone C^{14} et les composés volatils C^{14}) doivent être collectés individuellement pour chaque groupe et à chaque étape d'échantillonnage. Sur la base d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, on peut le cas échéant utiliser des cages ouvertes.

17. Les excréments sont collectés pendant la période d'exposition, soit 24 heures maximum après la première application sur la peau, puis ensuite chaque jour jusqu'à la fin de l'expérience. Si trois intervalles de collecte des excréments suffisent normalement, des points de collecte supplémentaires ou plus appropriés peuvent être définis pour une étude, selon l'objectif envisagé pour la préparation d'essai ou en fonction de données cinétiques existantes.

18. A la fin de la période d'exposition, le dispositif de protection est retiré de chaque animal et conservé individuellement aux fins d'analyse. La peau traitée de tous les animaux doit être nettoyée au moins trois fois à l'aide d'un agent et de tampons nettoyants appropriés. Un soin particulier doit être apporté de façon à ne pas contaminer d'autres zones du corps des animaux. L'agent lavant doit être représentatif des pratiques d'hygiène normales (par exemple, une solution d'eau savonneuse). Enfin, la peau doit être séchée. Tous les tampons et matériel de nettoyage utilisés doivent être conservés pour analyse. Un timbre propre doit être appliqué sur le site traité des animaux formant les derniers groupes, avant leur retour dans les cages métaboliques individuelles.

Procédures terminales

19. Pour chaque groupe, les animaux doivent être euthanasiés à l'échéance préétablie et leur sang collecté pour analyse. Le timbre ou le dispositif de protection doit être retiré pour analyse. La peau du site d'application et une surface de peau équivalente mais provenant d'une zone rasée non traitée doivent être prélevées sur chaque animal, et des analyses distinctes doivent être conduites. Le cas échéant, le site d'application peut être fractionné pour séparer le *stratum corneum* de l'épiderme sous-jacent, de façon à fournir des informations supplémentaires sur l'évacuation et le comportement de la substance chimique d'essai. En effet, déterminer le comportement/élimination du produit au cours d'un laps de temps donné après la période d'exposition donne une indication sur le devenir de n'importe quelle substance chimique dans le *stratum corneum*. Pour faciliter le fractionnement de la peau (après le dernier nettoyage et l'euthanasie des animaux), il faut d'abord retirer tous les timbres de protection. Ensuite, on prélève la peau du site d'application sur le rat, plus une bande circulaire autour du site, puis on épingle le tout sur une planche. On applique alors, par quelques pressions légères, une bande de ruban adhésif à la surface de la

peau. Cette bande est ensuite retirée, avec une partie du *stratum corneum*. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que la bande n'adhère plus à la surface de la peau, lorsque tout le *stratum corneum* a été retiré. Pour chaque animal, on peut combiner toutes les bandes d'adhésif dans un seul récipient, dans lequel on ajoute un digestif pour solubiliser le *stratum corneum*. Le cas échéant, on récupère tout éventuel tissu cible pour procéder à des mesures séparées, avant analyse de la carcasse résiduelle et mesure de la dose absorbée. Les carcasses des animaux doivent être conservées pour analyse. En règle générale, l'analyse du contenu total de la carcasse est suffisant, mais certains organes peuvent être retirés pour des analyses séparées (par exemple, si cela est indiqué par d'autres études). L'urine présente dans la vessie au moment de l'euthanasie doit être ajoutée à celle collectée auparavant. Après collecte des excréments dans les cages métaboliques au moment de l'euthanasie, les cages et leurs trappes doivent être nettoyées avec un solvant approprié. Les autres équipements potentiellement contaminés doivent également être analysés.

Analyse

20. Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir, une moyenne de 100 ± 10 pour cent de la radioactivité). Les récupérations en dehors de cette plage doivent faire l'objet de justification. Le volume de la dose administrée dans chaque échantillon doit être analysé selon des procédures suffisamment validées.

21. L'analyse statistique doit inclure une mesure de la variance des essais répétés de chaque application.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

22. Les mesures suivantes de la substance d'essai et/ou des métabolites doivent être effectuées sur chaque animal et à chaque point d'échantillonnage. Tous les résultats doivent être présentés individuellement, mais aussi groupés par point d'échantillonnage sous forme de moyenne.

- quantité associée aux dispositifs de protection ;
- quantité pouvant être récupérée de la peau ;
- quantité présente sur ou dans la peau et impossible à retirer par nettoyage ;
- quantité dans les échantillons de sang ;
- quantité dans les excréments et l'air expiré (le cas échéant) ;
- quantité restant dans la carcasse et tout organe éventuellement retiré pour analyse.

23. Les quantités de substance d'essai et/ou de métabolites trouvées dans les excréments, l'air expiré, le sang et la carcasse permettent de déterminer les quantités totales absorbées à chaque point. A partir de ces données, on peut calculer la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau exposée à la substance au cours de la période d'exposition.

Rapport d'essai

24. Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- données d'identification [par exemple, numéro CAS si disponible ; source ; pureté (pureté radiochimique) ; impuretés connues ; numéro du lot] ;

- état physique ; propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité, poids moléculaire et log P_{oe}).

Préparation d'essai :

- formulation et justification de l'utilisation ;
- détails de la préparation d'essai, quantité appliquée, concentration atteinte, véhicule, stabilité et homogénéité.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée ;
- nombre, âge et sexe des animaux utilisés ;
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc. ;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales :

- détails concernant l'administration de la préparation d'essai (site d'application, méthodes d'essai, occlusion/non-occlusion, volume, extraction, détection) ;
- détails concernant la qualité de l'eau et la nourriture.

Résultats:

- tout signe de toxicité ;
- tableau indiquant les données d'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentage) ;
- récupérations totales de l'expérience ;
- interprétation des résultats, avec comparaison avec toutes autres données éventuellement disponibles concernant l'absorption de la substance d'essai.

Discussion des résultats.

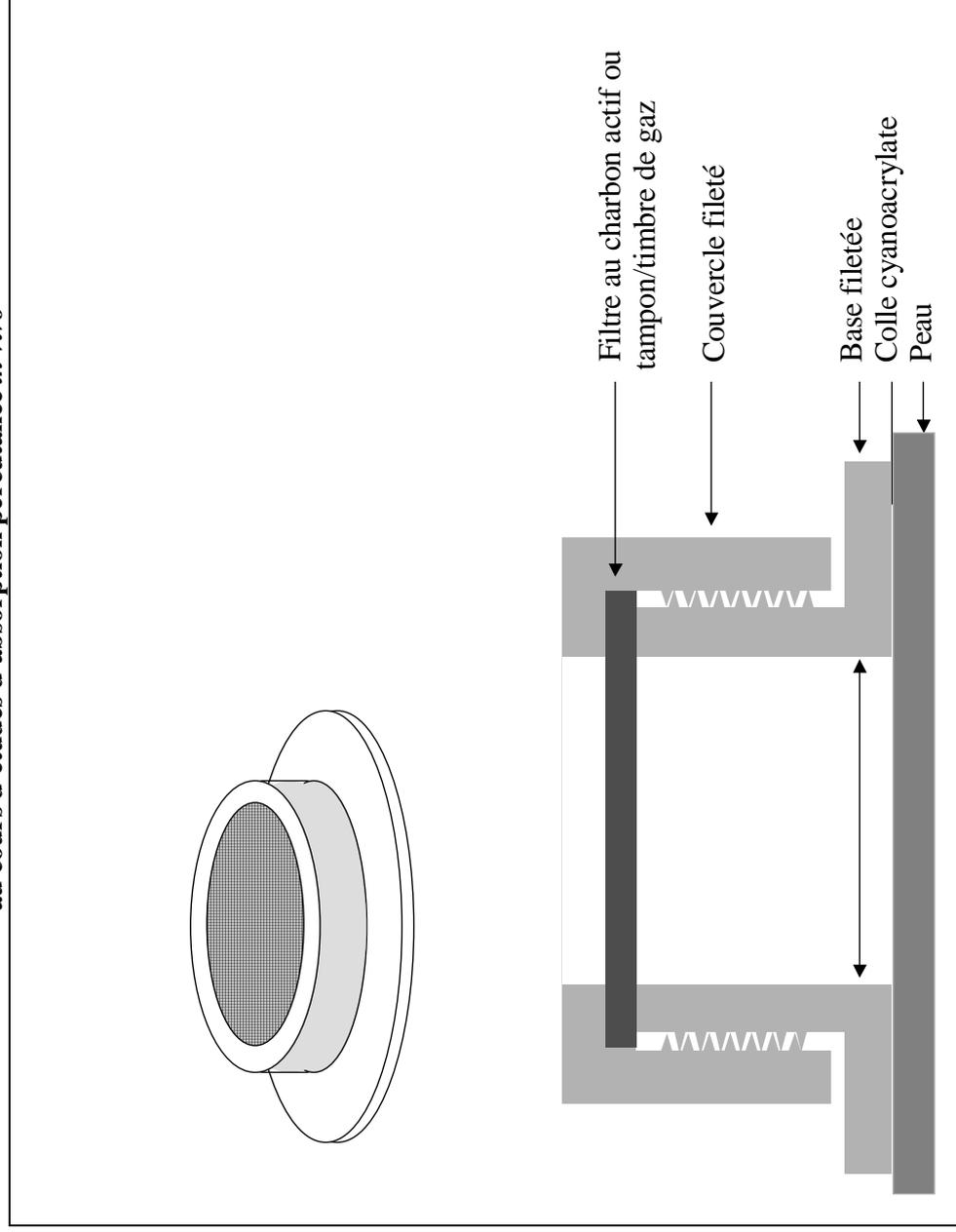
Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2004). Ligne directrice 428 - Absorption cutanée : méthode *in vitro*. OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2004). Document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée. OCDE, Paris.
- (3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques, Monographie No. 20.
- (4) Zendian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8 (5), 829-835.

- (5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- (6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
- (7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances,
- (8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI et Sarason R (1990) In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.
- (9) Feldman RJ et Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.* 54, 399-404.

Figure 1 : Exemple de dispositif classiquement utilisé pour délimiter et protéger un site d'application cutanée au cours d'études d'absorption percutanée *in vivo*



ANNEXEDÉFINITIONS

Dose non absorbée : la quantité retirée par nettoyage de la surface de la peau après exposition et toute quantité présente sur le timbre non-occlusif, y compris toutes les quantités volatilisées au cours de l'exposition.

Dose absorbée : (*in vivo*) les quantités présentes dans l'urine, les résidus ramassés dans la cage après nettoyage, les fèces, l'air expiré (le cas échéant), le sang, les tissus (si collectés) et la carcasse, après récupération de la peau du site d'application.

Dose absorbable : la quantité présente sur ou dans la peau après nettoyage.

