

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

Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BRDU-ELISA OU FCM

INTRODUCTION GENERALE

1. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique du fait d'un contact répété avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH) (1).
2. Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances dont on dispose actuellement sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, Adverse Outcome Pathway) (2) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont les dermatites de contact allergiques, en passant par les étapes intermédiaires. Cette AOP concerne les produits chimiques qui réagissent avec les thiols (donc la cystéine) et les amines primaires (donc la lysine), comme les substances organiques. Dans le cas présent, l'événement moléculaire initiateur (le premier événement clé) est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Ce premier événement clé peut-être évalué par la LD 442C de l'OCDE, essai in chemico de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA) (3). Le deuxième événement clé de l'AOP se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des changements d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE, *Antioxidant Response Element*). Cet événement clé peut-être évalué par la LD 442D de l'OCDE qui décrit les méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase in vitro (KeratinoSensTM et LuSens) (4). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques, habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule, les chimiokines et les cytokines. Il peut être évalué par test d'activation de la lignée cellulaire humaine (h-CLAT), le test d'activation de la lignée cellulaire U937 (U-

© OCDE (2018)

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: <http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation>.

Selon la Décision du Conseil de déléguer son autorité pour les amendements à l'Annexe I de la Décision du Conseil sur l'Acceptation Mutuelle des Données dans l'évaluation des produits chimiques [C(2018)49], cette Ligne directrice a été approuvée par la Réunion Conjointe du Comité des Produits Chimiques et le Groupe de Travail sur les Produits Chimiques, les Pesticides et la Biotechnologie, par procédure écrite le 25 juin 2018.

SENS™) ou l'essai par gène rapporteur de l'interleukine 8 (essai IL-8 Luc), essais décrits dans la LD 442E de l'OCDE (5). Le quatrième événement clé est la prolifération des lymphocytes T ; il est évalué de façon indirecte dans l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL).

3. La première Ligne directrice pour les essais (LD) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL ; LD 429) a été adoptée en 2002 et ensuite mise à jour (6). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). 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.

4. La présente Ligne directrice décrit deux variantes non radioactives de la méthode ELGL, qui fait appel à la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) (N° CAS [*Chemical Abstracts Service*] 59-14-3) non radiomarkée dans un essai de type ELISA [*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée] ou de type FCM [*Flow Cytometry Method*, ou méthode de cytométrie en flux] pour mesurer la prolifération des lymphocytes :

- L'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques : BrdU-ELISA (Appendice IA) et,
- L'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques : BrdU-FCM (Appendice IB)

5. À l'instar de l'ELGL, les méthodes ELGL: BrdU-ELISA et ELGL: BrdU-FCM s'intéressent à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournissent 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 (c'est-à-dire d'après la LD 406) (15).

6. La présente Ligne directrice permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques chez les animaux. La LD 406 fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (15). L'ELGL (LD 429) (6) et ses variantes non radioactives, ELGL: BrdU-ELISA and FCM (LD 442 B) et ELGL: DA (LD 442 A) (16), sont plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans la LD 406 (15) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

Références

- 1) UN, 2017. Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Seventh revised edition. United Nations, New York. Available at: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html
- 2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) OECD (2015), In Chemico Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442C, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 4) OECD (2015), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442D, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 5) OECD (2017), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442E, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 6) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 7) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- 8) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- 9) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- 10) 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 sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- 11) 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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- 12) 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.

- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 16) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 17) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, [ENV/JM/MONO\(2005\)14](#), OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Annexe I – Définitions

Analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (*Receiver operating Characteristic - ROC*) : analyse visant à déterminer une valeur seuil optimale pour le modèle prédictif. Les modèles prédictifs utilisant des valeurs seuils permettent aux produits chimiques testés d'être classés positifs ou négatifs. Toute variation de la valeur seuil entraînera des changements de la sensibilité et de la spécificité en sens opposé. L'analyse ROC est couramment utilisée pour obtenir des valeurs seuils optimales pour les tests diagnostiques.

AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables) : séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable in vivo, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (2).

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.

Danger : propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Faux négatif : produit chimique testé identifié à tort comme négatif ou inactif à l'issue de l'essai, alors qu'il est en fait positif ou actif (17). Le taux de faux négatifs est un des indicateurs de performance de la méthode d'essai.

Faux positif : produit chimique testé identifié à tort comme positif ou actif à l'issue de l'essai, alors qu'il est en fait négatif ou inactif (17). Le taux de faux positifs est un des indicateurs de performance de la méthode d'essai.

Fiabilité : indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (17).

Indice de stimulation (IS) : paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'un produit chimique testé, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concomitant recevant le véhicule.

Mélange : mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles.

Pertinence : décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (17).

Précision : étroitesse de l'accord 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 au sens de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (17).

Produits chimiques d'épreuve de compétence : sous-catégorie des produits chimiques de référence indiqués dans les normes de performance, et qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence technique à mettre en œuvre une méthode d'essai normalisée. En général, on sélectionne à cet effet des substances qui représentent toute la gamme des réponses, sont disponibles dans le commerce et pour lesquelles on dispose de données de référence de bonne qualité.

Produit chimique étalon : substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'un produit chimique testé. Un produit chimique 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.

Produits chimiques de référence : ensemble de produits chimiques pouvant être utilisés pour démontrer la capacité d'une nouvelle méthode d'essai à respecter les critères d'acceptabilité établis avec la ou les méthode(s) d'essai de référence validée(s). 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.

Produit chimique testé : le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est soumis à l'essai. Ce terme n'est pas lié à l'applicabilité des méthodes d'essais pour tester des substances mono-constituant, des substances multi-constituants et/ou des mélanges.

Reproductibilité : accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur la même substance selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (17).

Reproductibilité inter-laboratoires : mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes produits chimiques peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (17).

Reproductibilité intra-laboratoire : détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (17).

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.

Sensibilité : proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (17).

Spécificité : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (17).

Substance : élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (1).

Substance mono-constituant : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multi-constituants est le résultat d'une réaction chimique.

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

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

Appendice IA

Sensibilisation cutanée *in vivo*:

Essai de Stimulation Locale des Ganglions Lymphatiques: Brdu-ELISA

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. 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 (1) (2) (3).
2. La méthode ELGL: BrdU-ELISA est une variante non radioactive de l'ELGL visant à identifier les produits chimiques testés susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans un cadre précis. Cela n'implique pas que, dans le cas où l'utilisation d'une méthode *in vivo* est jugée nécessaire, l'ELGL: BrdU-ELISA doit systématiquement remplacer l'ELGL radioactif (LD 429) ou les essais sur cobayes (LD 406) (4), 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 (1) (2). Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur le produit chimique testé, 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 le produit chimique testé considérée (étant donné l'incompatibilité de certains types de substances d'essai avec l'ELGL: BrdU-ELISA [voir paragraphe 3]), et aider à choisir les doses appropriées.
3. 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. Par conséquent, il faudra porter une attention particulière au domaine d'application de méthodes *in vitro*, *in chemico* et *in silico* appropriées et par conséquent, envisager la possibilité d'utiliser ces approches plutôt que de tester sur l'animal. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (LD 406), la méthode ELGL: BrdU-ELISA et les autres méthodes ELGL sont susceptibles de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (4). En outre, l'ELGL: BrdU-ELISA propose une amélioration importante de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence de la LD 406 (4), 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. Cette méthode permet donc de réduire le stress des animaux. Malgré les avantages de l'ELGL: BrdU-ELISA par rapport à la LD 406 (4), certaines limites concernant les ELGL peuvent imposer de privilégier les essais sur cobayes (par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (5) (6), solubilité du produit chimique testé, en particulier des produits chimiques peu solubles ou non solubles). De surcroît, certains produits chimiques testés ou certaines familles de substances comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion, par exemple acides gras provenant du glutamate, acide oléique, ester de l'acide oléique, alcools gras, siloxane au groupes fonctionnels

polyaminés (7), peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (LD 406) (4). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (6) comme étant également valables pour l'ELGL: BrdU-ELISA (1). Dans ces limites, l'ELGL: BrdU-ELISA est applicable à toute substance 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) avec l'ELGL: BrdU-ELISA. 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) (1). 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.

4. Avant d'entreprendre des tests sur les mélanges, sur les substances difficiles à tester, ou sur les produits chimiques testés se trouvant à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats du test entrepris généreront des résultats scientifiquement valables.

5. Les définitions sont fournies à l'annexe I de l'introduction générale.

PRINCIPE DE L'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 du produit chimique testé. 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 concomitant 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 du produit chimique testé. Les méthodes 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 (1) (3). 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 minimale entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ou 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 (8) dans des cages à fond solide (9) avec un substrat adapté et des matériaux de construction du nid (10) (11) (12) (13), sauf si une raison scientifique pertinente exige alternativement un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués par une méthode humaine pour permettre leur identification individuelle, de préférence par une méthode non invasive de tonte des poils (14) (15), 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. Durant toute la durée des examens, les souris sont manipulées grâce à des méthodes non agressives telles que l'accueil dans le creux de la main ou l'utilisation d'un tunnel (16).

Préparation des solutions d'essai

10. Les produits chimiques testés, s'ils sont 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 produits chimiques liquides peuvent être appliqués purs ou préalablement dilués. Les produits chimiques insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux (35), 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 produits chimiques sont préparés chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

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 un produit chimique testé sensibilisant pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concomitant puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et inter-laboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL: BrdU-ELISA. De même, le recours systématique à

un TP concomitant 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 points par rapport au TV. 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 substances utilisées en priorité comme TP 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 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 concomitant demeure recommandée, des essais périodiques (à intervalles ≤ 6 mois) de la substance utilisée comme TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: 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 concomitant 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 de façon concomitante pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concomitant 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 systématiquement concomitants ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe du TP concomitant 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 la substance utilisée comme témoin positif soit testée dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone : huile d'olive, 4 :1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'essai avec un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (18). Si le composé utilisé comme TP concomitant est testé avec un véhicule différent de celui du produit chimique testé, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concomitant.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des produits chimiques appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des produits chimiques 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 produits chimiques. Les produits chimiques étalons adaptés présentent les propriétés suivantes:

- Similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie de produit chimique 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 OPÉRAIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations du produit chimique testé, ainsi qu'un groupe TV concomitant ne recevant que le véhicule utilisé pour ce produit chimique et un TP (concomitant 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 le produit chimique testé, 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 27. Trois 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 le produit chimique testé en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière à ce que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (19) (20). 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 du produit chimique testé. 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 (5) 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 le produit chimique testé 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 le produit chimique testé 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 (18). Du reste, certaines autorités réglementaires nationales exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: 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 du produit chimique testé 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 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 (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). 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 épaissement 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.

Table 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 % (21) (22), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins solvant/véhicule 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 µL d'une dilution adaptée du produit chimique testé, du véhicule seul ou du TP (concomitant 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 mesh). 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 TV 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 TV 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 celui de Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne, utilisé lors de l'étude de validation). D'autres kits de dosage peuvent être utilisés s'ils donnent des résultats cohérents. En bref, 100 µL de suspension de CGL sont ajoutés dans les puits d'une microplaque à fond plat, en triplicats. Après fixation et dénaturation des CGL, les anticorps anti-BrdU conjugués à la peroxidase sont ajoutés dans chaque puits pour leur permettre de réagir. Les anticorps anti-BrdU sont ensuite éliminés par lavage, puis la solution de substrat est ajoutée et chromogène synthétisé. L'absorbance à 370 nm est mesurée, 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 le produit chimique testé 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 :

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

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

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque $\text{IS} \geq 1.6$ (1). 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 (5) (32) (33).

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 (1). Diverses propriétés du produit chimique testé 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 (34).

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 concomitant). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de Williams pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés « valeurs aberrantes »).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les 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 concomitant.

Rapport d'essai

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

Produit chimique testé

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation, le cas échéant
- stabilité du produit chimique testé, si elle est connue

Substance mono-constituant

- apparence physique, hydrosolubilité, et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange

- caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants ;

Témoins

- données d'identification (par exemple numéro(s) CAS, le cas échéant ; source ; pureté ; impuretés connues ; numéro de lot) ;

Solvant/véhicule

- données d'identification (pureté ; concentration, s'il y a lieu ; volume utilisé)
- justification du choix du solvant/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 du produit chimique testé;
- Justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant);
- Concentrations utilisées pour le véhicule et le produit chimique testé, 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 le produit chimique testé, sa concentration, sur le TP, le TV et le produit chimique étalon utilisés, le cas échéant;
- Résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concomitant et/ou historique ainsi que pour le TV ;
- En l'absence d'un TP concomitant, 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 concomitant 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 le produit chimique testé 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 le produit chimique testé doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

Bibliographie

- <http://www.oecd.org/env/testguidelines>(1) 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, <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm> Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (2) 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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRRept2009.pdf]
- (3) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (4) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) 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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (6) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines> [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (8) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (9) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C
- (10) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002;36:243- 270
- (11) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2002; 76(1):65-81

- (12) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*. 2001;24:207-211
- (13) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. *NC3Rs*. Published January 2007.
<https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf>. Accessed 6 April 2018
- (14) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals*. 2013;47:2-11.
- (15) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. <https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf> Published 2008. Accessed 9 April 2018.
- (16) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*. 2010; 7:825–826
- (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. Available at: [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. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 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. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and 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. and 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. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

- (26) Hayes, B.B. and 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. and 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. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization 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. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](#), OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (33) 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. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- <http://www.oecd.org/env/testguidelines>(34) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (35) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

Appendice IB

Sensibilisation cutanée in vivo:

Essai de Stimulation Locale des Ganglions Lymphatiques: BrdU-FCM

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. La méthode ELGL: BrdU-FCM a été validée 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 (1) (2) (3) (4). L'étude de validation pour l'ELGL: BrdU-FCM a été réalisée conformément aux normes de performance (NP) pour l'évaluation des méthodes ELGL similaires ou modifiées proposées pour les essais de sensibilisation cutanée disponible à l'Annexe 1 de la Ligne directrice pour les essais (LD) de sensibilisation cutanée : essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (LD 429).

2. La méthode ELGL: BrdU-FCM est une variante non radioactive de l'ELGL visant à identifier les produits chimiques testés susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans un cadre précis. Cela n'implique pas que, dans le cas où l'utilisation d'une méthode in vivo est jugée nécessaire, l'ELGL: BrdU-FCM doit systématiquement remplacer l'ELGL radioactif (LD 429) ou les essais sur cobayes (LD 406) (5), 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 (1) (2). Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur le produit chimique testé, 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-FCM avec le produit chimique testé considérée (étant donné l'incompatibilité de certains types de substances d'essai avec l'ELGL: BrdU-FCM [voir paragraphe 3]), et aider à choisir les doses appropriées.

3. La méthode ELGL: BrdU-FCM, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Par conséquent, il faudra porter une attention particulière au domaine d'application de méthodes in vitro, in chemico et in silico appropriées et par conséquent, envisager la possibilité d'utiliser ces approches plutôt que de tester sur l'animal. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (LD 406), la méthode ELGL: BrdU-FCM et les autres méthodes ELGL sont susceptibles de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (5). En outre, l'ELGL: BrdU-FCM propose une amélioration importante de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence de la LD 406 (5), l'ELGL: BrdU-FCM n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL: BrdU-FCM ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye. Cette méthode permet donc de réduire le stress des animaux. Malgré les avantages de l'ELGL: BrdU-FCM par rapport à la LD 406 (5), certaines limites concernant les ELGL peuvent imposer de privilégier les essais sur cobayes (par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (7), solubilité du produit chimique testé, en particulier des produits chimiques peu solubles ou non solubles). De surcroît, certains

produits chimiques testés ou certaines familles de substances comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion, par exemple acides gras provenant du glutamate, acide oléique, ester de l'acide oléique, alcools gras, siloxane au groupes fonctionnels polyaminés (8), peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (LD 406) (5). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (7) comme étant également valables pour l'ELGL: BrdU-FCM (1). Dans ces limites, l'ELGL: BrdU-FCM est applicable à toute substance qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. Selon l'étude de validation, l'ELGL: BrdU-FCM a correctement identifié 20 des 22 substances de référence listées dans la NP de la LD 429 sur la base des résultats de l'ELGL (1). Un sensibilisant cutané modéré, le 2-mercaptobenzothiazole et un sensibilisant cutané faible, le méthyl méthacrylate, pour lesquels d'autres variantes du ELGL présentent une prédiction limitée ont été mal classifiés avec l'ELGL: BrdU-FCM (1) (2) (9).

4. Avant d'entreprendre des tests sur les mélanges, sur les substances difficiles à tester, ou sur les produits chimiques testés se trouvant à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats du test entrepris généreront des résultats scientifiquement valables.

5. Les définitions sont fournies à l'annexe I de l'introduction générale.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. L'ELGL: BrdU-FCM repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application du produit chimique testé. 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 concomitant pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 2.7, on peut ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée du produit chimique testé. Les méthodes 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 FCM, grâce à un anticorps spécifique de la BrdU marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La technique FCM permet de quantifier le nombre de cellules viables BrdU positives en utilisant un cytomètre en flux, qui est couramment utilisé dans l'analyse des populations de lymphocytes.

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-FCM ont été menées exclusivement avec la souche BALB/c, qui sera donc privilégiée pour cet essai (1) (2). La souche CBA/J peut aussi être utilisée avec l'ELGL: BrdU-FCM. Les réponses obtenues avec la souche CBA/J sont hautement corrélées avec

les réponses obtenues avec la souche BALB/c et sont plus sensibles (2) (10) (11) (12). Cependant, il convient d'adopter pour chaque souche des valeurs seuils d'IS différentes pour en maximiser la sensibilité après analyse de la fonction d'efficacité du récepteur. 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 ou 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-FCM.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (13) dans des cages à fond solide (34) avec un substrat adapté et des matériaux de construction du nid (35) (36) (37) (38), sauf si une raison scientifique pertinente exige alternativement un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués par une méthode humaine pour permettre leur identification individuelle, de préférence par une méthode non invasive de tonte des poils (39) (40), 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. Durant toute la durée des examens, les souris sont manipulées grâce à des méthodes non agressives telles que l'accueil dans le creux de la main ou l'utilisation d'un tunnel (41).

Préparation des solutions d'essai

10. Les produits chimiques testés, s'ils sont 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 produits chimiques liquides peuvent être appliqués purs ou préalablement dilués. Les produits chimiques insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux (33), 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 produits chimiques sont préparés chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

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 un produit chimique testé sensibilisant pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concomitant puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai

correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et inter-laboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL: BrdU-FCM. De même, le recours systématique à un TP concomitant 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-FCM pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation supérieur d'au moins 2.7 points par rapport au TV. 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 > 27 sera considéré comme excessif, par exemple). Les substances utilisées en priorité comme TP 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 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 concomitant demeure recommandée, des essais périodiques (à intervalles ≤ 6 mois) de la substance utilisée comme TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: BrdU-FCM 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-FCM 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 concomitant à chaque fois que le protocole de l'ELGL: BrdU-FCM 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 de façon concomitante pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concomitant 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 systématiquement concomitants ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe du TP concomitant 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 (14).

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

concomitant est testé avec un véhicule différent de celui du produit chimique testé, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concomitant.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des produits chimiques appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des produits chimiques 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 produits chimiques. Les produits chimiques étalons adaptées présentent les propriétés suivantes:

- Similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie de produit chimique à tester;
- Caractéristiques physiques et chimiques connues;
- Données obtenues avec l'ELGL: BrdU-FCM;
- Données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRAIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations du produit chimique testé, ainsi qu'un groupe TV concomitant ne recevant que le véhicule utilisé pour ce produit chimique et un TP (concomitant 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 le produit chimique testé, 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. Trois 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 le produit chimique testé en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière à ce que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (16) (17). 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 du produit chimique testé. 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 le produit

chimique testé 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 le produit chimique testé 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 (14). Du reste, certaines autorités réglementaires nationales exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: BrdU-FCM. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: BrdU-FCM 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 du produit chimique testé 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-FCM, 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 (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 (17). 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 épaissement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (18) (19). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: BrdU-FCM 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.

Table 2. 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 % (18) (19), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins solvant/véhicule a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (22) (23) (24) (25) (26).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (27) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: BrdU-FCM: 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 (28).

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 du produit chimique testé, du véhicule seul ou du TP (concomitant 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 0.1 mL (2 mg/souris) d'une solution de BrdU (20 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 (14). 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 mesh). 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 TV étant petits, il importe de les manipuler avec précaution afin d'éviter toute perturbation des valeurs IS. Les CGL sont récoltés avec un volume approprié de PBS froid (par exemple, 2 mL) et, si nécessaire, la suspension de CGL peut être diluée (par exemple, dilution au 1/10). Le nombre de CGL est compté, 1.5×10^6 CGL étant nécessaires pour l'étape suivante.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification des lymphocytes BrdU positifs)

27. Les lymphocytes BrdU positifs sont comptés par FCM à l'aide d'un kit commercial (par exemple celui de BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA, utilisé lors de l'étude de validation). D'autres kits d'anticorps anti-BrdU peuvent être utilisés s'ils donnent des résultats cohérents. En bref, la suspension de CGL (1.5×10^6) est lavée une fois avec le PBS par centrifugation puis remise en suspension. Les cellules sont perméabilisées avec le tampon fourni avec le kit puis traitées par ADNase. Après l'étape de lavage, l'anticorps anti BrdU FITC-conjugué est ajouté et après un nouveau lavage, une solution de 7-aminoactinomycine D (7-AAD) est ajoutée. Le nombre de cellules BrdU positives au sein de la population de cellules viables exprimant 7-AAD (10^4) est compté avec un cytomètre en flux.

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 (28).

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 pour LLNA: BrdU-FCM en divisant le nombre de CGL positives au marquage BrdU/souris dans le groupe traité avec un produit chimique d'essai par le nombre moyen de CGL positives au marquage BrdU dans le groupe solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

Le nombre de CGL BrdU-positives est défini comme suit (voir Appendice IB – Annexe 1 paragraphe 7):

Nombre de CGL BrdU-positives = % de CGL BrdU-positives (% de Q2¹) × nombre de CGL

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque $IS \geq 2.7$ (1) (2) (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 est jugé positif (6) (29) (30).

32. S'il est nécessaire de clarifier les résultats obtenus, diverses propriétés du produit chimique testé seront 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 (31).

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 concomitant). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de Williams pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés « valeurs aberrantes »).

¹ les pourcentages (% dans la région Q2) à partir des « statistiques relatives aux quadrants » dans l'analyse par cytométrie en flux

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant le nombre de CGL positives au marquage BrdU pour chaque animal, la moyenne du nombre de CGL positives au marquage BrdU/animal pour chaque groupe, ou 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 concomitant.

Rapport d'essai

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

Produit chimique testé

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation, le cas échéant
- stabilité du produit chimique testé, si elle est connue

Substance mono-constituant

- apparence physique, hydrosolubilité, et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange

- caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants ;

Témoins

- données d'identification (par exemple numéro(s) CAS, le cas échéant ; source ; pureté ; impuretés connues ; numéro de lot) ;

Solvant/véhicule

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

Animaux d'essai:

- Source des souris BALB/c ou 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 FCM;
- Détails concernant la préparation et l'application du produit chimique testé;
- Justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant);
- Concentrations utilisées pour le véhicule et le produit chimique testé, 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 le produit chimique testé, sa concentration, sur le TP, le TV et le produit chimique étalon utilisés, le cas échéant;
- Résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concomitant et/ou historique ainsi que pour le TV ;
- En l'absence d'un TP concomitant, 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 concomitant 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 du nombre de CGL positives au 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) pour le nombre de CGL positives au 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 le produit chimique testé 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 le produit chimique testé doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

Bibliographie

(1) OECD (2018), Local Lymph Node Assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method (LLNA: BrdU-FCM) Validation Study Report, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 283, ENV/JM/MONO(2018)43, OECD, Paris.

(2) OECD (2018), Summary of the Peer Review of the Validation Study for LLNA: BrdU-FCM Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 284, ENV/JM/MONO(2018)44, OECD.

(3) Yang H, Na J, Jang WH, Jung MS, Jeon JY, Heo Y, Yeo KW, Jo JH, Lim KM, Bae SJ. (2015), Appraisal of within- and between-laboratory reproducibility of non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry, LLNA: BrdU-FCM: Comparison of OECD TG429 performance standard and statistical evaluation. *Toxicology Letters* 234: 172-179.

(4) Ahn IY, Kim TS, Jung ES, Yi JS, Jang WH, Jung KM, Park MY, Jung MS, Jeon EY, Yeo KY, Jo JH, Park JE, Kim CY, Park YC, Seong WK, Lee AY, Chun YJ, Jeong TC, Jeung EB, Lim KM, Bae SJ, Sohn SJ, Heo Y. (2016), Performance standards based validation study for Local Lymph Node Assay: 5-Bromo-2-Deoxyuridine-flow cytometry method. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 80:183-194.

(5) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

- (7) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (9) Kolle SN, Basketter DA, Casati S, Stokes WS, Strickland J, Ravenzwaay BV, Vohr HW, Landsiedel R 2013. Performance standards and alternative assays: Practical insights from skin sensitization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 65: 278-285
- (10) Lee YS, Yi JS, Seo SJ, Kim JH, Jung MS, Seo IK, Ahn IY, Ko KY, Kim TS, Lim KM, Sohn SJ. (2017), Comparison of BALB/c and CBA/J mice for the local lymph node assay using bromodeoxyuridine with flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33:13-22.
- (11) Ha SJ, Ahn IY, Kim DE, Lee JK, Sohn SJ, Jung MS, Heo Y, Omori T, Bae SJ, Lim KM. (2017) Evaluation of radioisotopic and non-radioisotopic versions of local lymph node assays for subcategorization of skin sensitizers compliant to UN GHS rev 4. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 85:124-131.
- (12) Maeda, Y., Hirosaki, H., Yakata, N., Takeyoshi, M. (2016), Comparison of outcomes obtained in murine local lymph node assays using CBA/J or CBA/Ca mice. *J. Appl. Toxicol.* 36:1011-4.
- (13) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (14) 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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (15) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (17) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (18) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (19) 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. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].

- (20) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (21) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (22) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (23) Hayes, B.B. and 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.
- (24) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and 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.
- (25) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (26) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (27) 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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (28) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](#), OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (29) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (30) 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. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (31) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (32) Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, et al. 2004. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50:274-288.

- (33) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.
- (34) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C
- (35) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002;36:243- 270
- (36) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2002; 76(1):65-81
- (37) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*. 2001; 24:207-211
- (38) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf>. Accessed April 06, 2018
- (39) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals*. 2013;47:2-11.
- (40) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. <https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf> Published 2008. Accessed 9 April 2018.
- (41) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*. 2010;7:825–826

Appendice IB- Annexe I: Mesure par cytométrie en flux des cellules de ganglions lymphatiques positives au marquage BrdU

Cette méthode est basée sur le protocole LLNA (*Local Lymph Node Assay*): BrdU-FCM, qui a été utilisé pour l'étude de validation coordonnée par le KoCVAM (1). Il est recommandé d'utiliser ce protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation du LLNA: BrdU-FCM en laboratoire.

Préparation avant la mesure

36. Pour mesurer la BrdU incorporée, les échantillons suivants doivent être préalablement préparés :

- Échantillon blanc (n=1) : CGL de la souris n'ayant pas reçu d'injection de BrdU.
- Échantillon non traité (n=1) : CGL de la souris non traitée avec des substances, mais ayant reçu une injection de BrdU.
- Échantillon témoin traité avec le solvant (n \geq 4) : CGL de la souris traitée avec le solvant et ayant reçu une injection de BrdU.
- Échantillon traité avec un produit chimique d'essai (n \geq 4, au minimum trois concentrations) : CGL de la souris traitée avec un produit chimique d'essai et ayant reçu une injection de BrdU.
- Échantillon témoin positif (n \geq 4) : CGL de la souris traitée avec le témoin positif et ayant reçu une injection de BrdU.

Analyse des résultats de la cytométrie en flux

2. Un cytomètre en flux doit être étalonné à l'aide d'outils appropriés (« BD FACSComp » pour le FACSCaliburTM ou « Beckman Coulter FlowCheck » pour le Tomomics FC500, par exemple) avant l'essai ou régulièrement.

Graphique FSC-SSC (granulosité (diffusion latérale, SSC) en fonction de la taille (diffusion axiale, FSC) des cellules)

- 1) L'échelle de l'axe des abscisses (FSC) et de l'axe des ordonnées (SSC) est linéaire.
- 2) Définir une zone avec une masse de ganglions lymphatiques viables en son centre dans le graphique FSC-SSC.
- 3) Tracer les contours de la zone de telle sorte qu'elle contienne au moins 10 000 cellules.

Graphique 7-AAD-BrdU

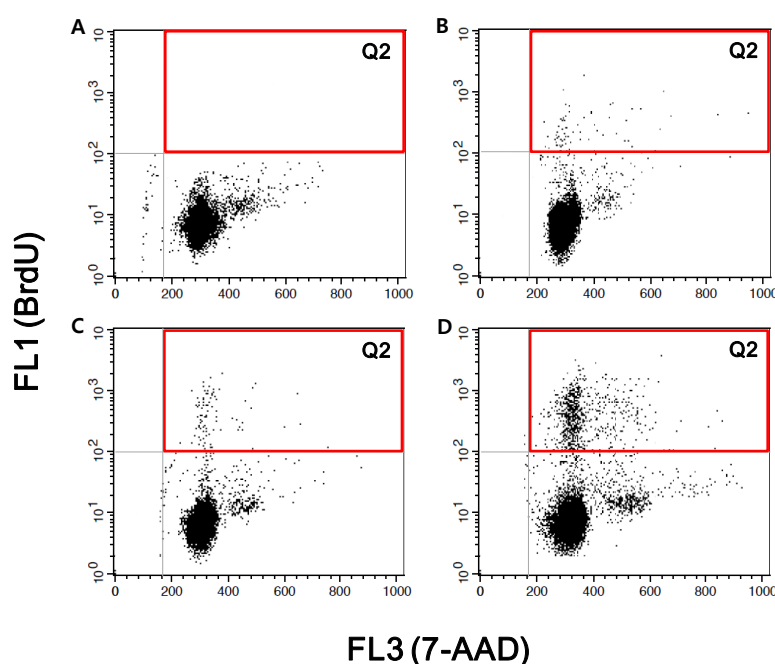
- 1) L'échelle de l'axe des abscisses (7-AAD, FL3) est linéaire, tandis que celle de l'axe des ordonnées (BrdU, FL1) est logarithmique (Figure 1).

* La compensation doit être réglée une fois à l'aide d'échantillons non marqués, uniquement marqués par la BrdU, uniquement marqués par la 7-AAD, et doublement marqués à la fois par l'anti-BrdU et la 7-AAD au début de cet essai. Elle peut être sauvegardée aux fins d'utilisation future.

Suivre les étapes suivantes pour déterminer Q2

- 1) À l'aide de l'échantillon blanc, déterminer Q2 (en haut à droite) là où il n'y a pas de cellules (Figure 1A).
- 2) En utilisant l'échantillon non traité, déterminer Q2 de façon à ce que le pourcentage de cellules positives au marquage BrdU représente environ 1 % du nombre total de cellules (Figure 1B).
- 3) Le pourcentage de la région Q2 indique la proportion de lymphocytes vivants positifs au marquage par les anticorps anti-BrdU conjugués FITC dans 10 000 CGL.

Figure 1. Configuration de la cytométrie en flux pour le calcul du pourcentage de cellules positives au marquage BrdU (% de Q2)



Note : A, échantillon blanc ; B, échantillon non traité ; C, échantillon témoin traité avec le solvant ; D, échantillon traité avec un produit chimique d'essai ou échantillon témoin positif

Calcul du pourcentage de cellules positives au marquage BrdU

3. Réaliser les expériences de cytométrie en flux pour les échantillons témoins traités avec le solvant (figure 1C), les échantillons traités avec un produit chimique d'essai et les échantillons témoins positifs (figure 1D). Obtenir les pourcentages (% dans la région Q2) à partir des « statistiques relatives aux quadrants » pour chaque échantillon.

Calcul de l'indice de stimulation (IS) et de la concentration estimée pour IS = 2.7 (EC2.7)

4. Le nombre de CGL positives au marquage BrdU dans les GL du groupe témoin traité avec le solvant est obtenu en multipliant le nombre de CGL présentes dans les GL par le pourcentage de cellules exprimant la BrdU dans 10 000 CGL (obtenu par cytométrie en flux). Le nombre de CGL positives au marquage BrdU dans les GL du groupe traité avec un produit chimique d'essai est obtenu par la méthode décrite ci-dessus. Les IS

individuels sont calculés en divisant le nombre de CGL positives au marquage BrdU/souris dans le groupe traité avec un produit chimique d'essai par le nombre moyen de CGL positives au marquage BrdU dans le groupe témoin traité avec le solvant. L'IS moyen de chaque groupe traité avec un produit chimique d'essai est calculé sur la base des IS individuels.

$$\text{Indice de stimulation (IS)} = \frac{\text{nombre de CGL positives au marquage BrdU/souris exposée à un produit chimique d'essai}}{\text{nombre moyen de CGL positives au marquage BrdU dans le groupe témoin traité avec le solvant}}$$

5. Pour les résultats positifs, la valeur EC2.7, c'est-à-dire une concentration estimée correspondant à un IS de 2,7, pourrait être calculée par régression linéaire à l'aide de l'équation suivante. D'autres méthodes d'estimation (formules d'interpolation ou d'extrapolation linéaire, par exemple) pourraient être utilisées pour calculer la valeur EC2.7 (32) :

$$Y (\text{IS}) = aX(\text{concentration}) + b \rightarrow \text{EC2.7} = (2.7-b)/a$$

* Les paramètres a (pente) et b (ordonnée à l'origine) peuvent être déduits en appliquant la méthode des moindres carrés.