Adoptée:
28 juillet 2015

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

Effet irritant/corrosif aigu sur la peau

INTRODUCTION

1. Régulièrement mises à jour, les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques intègrent les meilleures données scientifiques disponibles. La révision de la présente Ligne directrice a porté plus particulièrement sur les possibilités d'améliorer le traitement des animaux de laboratoire et sur l'évaluation de toutes les informations existantes se rapportant aux produits chimiques testés en vue d'éviter les tests inutiles sur animaux. Cette nouvelle version de la Ligne directrice 404 (initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) comprend une référence au Document Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation (IATA en anglais) pour l'irritation et la corrosion de la peau (1). Ce Document Guide propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon 1) d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques testés, et 2) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (1). La présente Ligne directrice recommande également d'opter, si cela s'avère nécessaire, pour une application successive plutôt que simultanée des trois timbres sur l'animal dans l'essai *in vivo* initial.

2. Les définitions de l'irritation et de la corrosion cutanées sont données en annexe à cette Ligne directrice.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

3. Pour assurer à la fois la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* tant que toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau du produit chimique testé n'auront pas été évaluées au cours d'une analyse de leur valeur, telle que décrite dans le Document Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation (IATA en anglais) pour l'irritation et la corrosion de la peau (1), c'est-à-dire selon chacune des trois parties de ce Guide et de chacun des modules correspondants. De façon concise, la partie 1 couvre les données existantes reparties dans sept modules comprenant les données humaine in vivo, les données in vitro, les propriétés physico-chimiques (par exemple le pH, en particulier s'il est fortement acide ou alcalin) et les données autres que provenant d'essais. La partie 2 comprend une analyse des données existantes. Si cette analyse ne permet pas de conclure, la partie 3 doit être mise en œuvre avec des essais supplémentaires, en partant des essais in vitro, étant donné que les essais in vivo ne seront considérés qu'en dernier ressort.

© OCDE, (2015)
L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

Cette analyse doit donc permettre de diminuer le recours aux essais *in vivo* de l'effet corrosif ou irritant sur la peau des produits chimiques pour lesquels des études précédentes ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects.

PRINCIPE DE L'ESSAI *IN VIVO*

4. Une seule dose du produit chimique testé est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

5. Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation du produit chimique testé. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrants fortement sont exposés dans un autre document d'orientation (2).

PRÉPARATION DE L'ESSAI *IN VIVO*

Sélection de l'espèce animale

6. On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

Préparation des animaux

7. Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

8. La fourrure de certaines souches de lapins est plus touffue par endroits et ce phénomène est plus marqué à certaines périodes de l'année. Ces plages à forte pilosité ne doivent pas recevoir la substance d'essai.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

9. Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20°C (±3°C) pour les lapins. Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent sans excéder de préférence 70 pour cent, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

MODE OPÉRATOIRE

Application de la substance d'essai

© OCDE, (2015)

10. Le produit chimique testé est appliqué sur une petite zone (environ 6 cm^2) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, assujettie au moyen d'un sparadrap non irritant. Si l'application directe est impossible (dans le cas de liquides ou de certaines pâtes, par exemple), le produit chimique testé est d'abord appliqué sur la compresse de gaze, laquelle est ensuite placée sur la peau. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. Si le produit chimique testé est déposé sur la compresse, celui-ci doit être fixée sur la peau de façon à ce que le produit chimique soit réparti uniformément et entre bien en contact avec celle-ci. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler le produit chimique testé.

11. Les produits chimiques liquides sont généralement testées à l'état non dilué. Si le produit chimique est solide (il peut être pulvérisé si nécessaire), il y a lieu de l'humidifier avec la plus petite quantité d'eau (ou au besoin d'un autre véhicule approprié) nécessaire à assurer un bon contact avec la peau. Lorsqu'on utilise un véhicule autre que l'eau, l'influence éventuelle du véhicule sur l'irritation de la peau par le produit chimique testé doit être minimale.

12. À la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être du produit chimique testé restant, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme.

Dose

13. Une dose de 0,5 mL de liquide ou de 0,5 g de solide ou de pâte est appliquée sur la plage à tester.

Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée *in vivo* sur un seul animal)

14. Dès lors qu'un produit chimique testé est jugé corrosif, irritant ou non classé d'après l'analyse des données existantes ou d'essais *in vitro* préalables, tout essai sur animal s'avère superflu. Toutefois, si l'on estime que des données supplémentaires sont nécessaires, le test *in vivo* est conduit initialement en utilisant un seul animal et en respectant la procédure suivante. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué à un endroit différent et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction.

15. Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

16. Dans les cas où l'on s'attend à ce que le produit chimique testé soit peut-être irritant, mais pas corrosif, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée sur des animaux supplémentaires)

17. Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par

© OCDE, (2015)

l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

Période d'observation

18. La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

19. L'observation des signes d'érythème et d'oedème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau ci-dessous. Si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels que le dégraissage de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple, des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. L'examen histopathologique est à envisager au cas où il faut éclaircir des réactions équivoques.

20. La cotation des réactions cutanées est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions cutanées et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé (voir tableau ci-dessous). Un manuel illustré sur la cotation de l'irritation cutanée et d'autres lésions pourrait être utile (10).

RÉSULTATS ET RAPPORT

21. Les résultats de l'étude devraient être récapitulés dans un tableau joint au rapport d'essai final et couvrir tous les aspects énumérés au paragraphe 24.

Évaluation des résultats

22. Le degré d'irritation cutanée devrait être évalué conjointement avec la gravité des lésions et leur caractère réversible. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. En revanche, les cotes individuelles doivent être considérées comme des valeurs de référence, à évaluer en combinaison avec toutes les autres observations effectuées au cours de l'étude.

© OCDE, (2015)

23. L'évaluation des réactions d'irritation doit tenir compte de la réversibilité des lésions cutanées. Si des réactions, telles que l'alopécie (sur une aire limitée), l'hyperkératose, l'hyperplasie et la desquamation, persistent jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours, il y a lieu de considérer le produit chimique testé comme irritant.

Rapport d'essai

24. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Justification de l'essai *in vivo*: analyse de la valeur des résultats disponibles avant l'essai, notamment des résultats de la démarche expérimentale séquentielle:
- description des données pertinentes livrées par des essais précédents;
- données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale;
- description des essais in vitro effectués exposant le détail des procédures et les résultats obtenus avec les substances d'essai et de référence;
- comment l'analyse de la valeur des résultats a débouché sur la décision de conduire l'étude *in vivo*.

Produit chimique testé:

Substance mono-constituant

- Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

Substance multi-constituants, substance de composition inconnue ou variable, produits réactionnels complexes et matériaux biologiques (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, selon les données disponibles ;
- Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- Source et numéro de lot si disponible ;
- Traitement du produit chimique testé avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);
- Stabilité du produit chimique testé, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Véhicule:
- identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience

© OCDE, (2015)

- espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;
- nombre d'animaux de chaque sexe;
- poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;
- âge des animaux au début de l'essai;
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions expérimentales:

- technique de préparation du site d'application;
- détails concernant la composition du timbre et la technique d'application de ce dernier;
- détails sur la préparation, l'application et l'enlèvement du produit chimique testé.

Résultats:

- tableau faisant apparaître, pour chaque animal et à chaque relevé, les cotes attribuées aux réactions d'irritation/corrosion observées;
- description de toutes les lésions observées;
- description circonstanciée de la nature et du degré d'irritation ou de corrosion observé, et de tout effet histopathologique;
- description de tout autre effet local néfaste (par exemple le dégraissage de la peau) et des effets systémiques.

Discussion des résultats.

© OCDE, (2015)

BIBLIOGRAPHIE

(1) OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 203.) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD. (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as Endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 [http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.html].

(3) 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 Publications, Series on Testing and Assessment (No. 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

© OCDE, (2015)

TABLEAU: COTATION DES RÉACTIONS CUTANÉES

Formation d'érythème et d'escarre

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

Maximum possible: 4

Formation d'oedème

Pas d'oedème	0
Oedème très léger (à peine perceptible)	1
Oedème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Oedème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Oedème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4

Maximum possible: 4

Un examen histopathologique pourra être conduit pour éclaircir des réactions douteuses.

© OCDE, (2015)

ANNEXE

DÉFINITIONS

1. L'irritation cutanée désigne l'apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'un produit chimique testé durant une période de quatre heures au maximum.

2. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'un produit chimique testé durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au pâlissement de la peau, des zones d'alopécie totale et des escarres. On envisagera un examen histopathologique s'il faut élucider des lésions douteuses.

© OCDE, (2015)