



Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 406

Sensibilisation de la peau

30 juin 2022

**Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques**



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

Sensibilisation de la peau : test de Magnusson et Kligman et test de Buehler

1. INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont périodiquement revues afin de refléter les meilleures avancées scientifiques. Lors de la révision de la présente Ligne directrice, une attention particulière a été portée à ce qui pourrait améliorer les préoccupations de bien-être des animaux. Cette mise à jour de la Ligne directrice 406 (dont la version originale a été adoptée en 1981, puis révisée en 1992, et en 2021) prend en compte et met en avant les nouvelles Lignes directrices de sensibilisation cutanée. Bien que cette Ligne directrice a été utilisée pour des tests de sensibilisation pendant plusieurs décennies, les utilisateurs doivent savoir que d'autres Lignes directrices de sensibilisation cutanée in chemico, in vitro et in vivo sont maintenant disponibles. Ces nouvelles Lignes directrices et les autres sources d'information disponibles doivent être considérées avant de procéder à des nouveaux essais sur cobaye.
2. Le test sur cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et test de Buehler utilisent tous deux des animaux. Qu'en dernier recours si cela est justifié, p.ex. quand les autres tests de sensibilisation cutanée ne sont pas applicables.
3. Dans la Ligne directrice 406 originale, quatre tests avec adjuvants et trois tests sans adjuvants étaient considérés acceptables. La présente Ligne directrice décrit deux types de tests : le test sur cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman qui utilise un adjuvant (adjuvant complet de Freund) pour potentialiser la sensibilisation cutanée (1)(2)(3) et le test sans adjuvant de Buehler (5)(6). Les deux procédures sont décrites en détail.
4. Le test de Buehler a montré une sensibilité moindre que le test de maximisation sur cobaye (GPMT) (7)(8). Les deux tests fournissent des données sur le potentiel de sensibilisation cutanée et une information quantitative limitée sur la puissance de sensibilisation, en fonction du niveau de dose sélectionné. Si des informations quantitatives sur la puissance de sensibilisation est requise, d'autres méthodes d'essai (tel que l'essai local sur les ganglions lymphatiques (LLNA) ou des méthodes non animales) devront être utilisées pour fournir l'information sur la puissance sensibilisante.
5. Les définitions utilisées figurent en annexe de la Ligne directrice.

2. PRINCIPE GÉNÉRAL DES ESSAIS DE SENSIBILISATION SUR LE COBAYE

6. Les animaux sont une première fois exposés au produit chimique testé par injection intradermique et/ou par application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle peut se développer une réponse immunitaire, les animaux sont exposés à une dose déclenchante. L'étendue et le degré de la réaction cutanée à l'exposition déclenchante chez les animaux traités sont comparés à ceux obtenus chez les animaux témoins qui ont subi un traitement identique, la substance exceptée, pendant l'induction et qui ont été soumis à l'exposition déclenchante.

3. ÉLÉMENTS COMMUNS AUX ESSAIS DE SENSIBILISATION SUR LES COBAYES

3.1. Choix d'animaux

7. On peut utiliser de jeunes adultes sains mâles et/ou femelles. Si l'on utilise des femelles, il faut qu'elles soient nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. La température de l'animalerie doit être de 20°C (\pm 3°C), avec un taux d'humidité relative de 30 à 70 pour cent. Si l'on utilise la lumière artificielle, la séquence utilisée doit être de 12 heures d'éclairage et de 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire sera le régime de laboratoire classique avec eau potable à volonté. Il est essentiel que les cobayes reçoivent une quantité appropriée d'acide ascorbique pour maintenir une bonne condition de santé.

3.2. Préparation des animaux

9. Les animaux sont acclimatés aux conditions de laboratoire pendant au moins 5 jours avant l'essai. Avant l'expérience, les animaux sont choisis au hasard et répartis en différents groupes soumis au traitement. Le poil est tondu, rasé ou enlevé par épilation chimique, selon la méthode d'essai utilisée. On doit prendre soin d'éviter toute abrasion de la peau. Les animaux sont pesés au début et à la fin de l'essai.

3.3. Vérification de la fiabilité

10. La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée doivent être vérifiées dans les six mois précédents en utilisant des substances dont le pouvoir sensibilisant est connu comme étant léger à modéré.

11. Pour les substances qui possèdent un pouvoir sensibilisant léger à modéré, dans un essai correctement mené, on doit s'attendre à une réponse d'au moins 30 pour cent quand on utilise un adjuvant, et d'au moins 15 pour cent quand on n'utilise pas. On utilisera de préférence les substances suivantes: l'aldéhyde hexylcinnamique (CAS n° 101-86-0), le mercaptobenzothiazole (CAS n° 149-30-4) et la benzocaïne (CAS n° 94-09-7). Les concentrations des sensibilisants choisis pour les vérifications de sensibilité et de fiabilité doivent être proches des seuils de sensibilisation. Dans certains cas, on peut employer d'autres substances de contrôle, à condition de fournir des justifications appropriées (9).

3.4. Élimination du produit chimique testé

12. Si l'on considère qu'il est nécessaire d'éliminer le produit chimique testé, ceci doit être fait en utilisant de l'eau ou un solvant approprié, sans modifier la réponse existante ou l'intégrité de l'épiderme.

4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DE MAXIMISATION SUR LE COBAYE

4.1. Nombre d'animaux

13. On utilise un minimum de 10 animaux dans le groupe de traitement et de 5 animaux dans le groupe témoin. Quand on utilise moins de 20 cobayes dans le groupe traité et moins de 10 dans le groupe témoin, et qu'il n'est pas possible de conclure que le produit chimique testé a un pouvoir sensibilisant, il est fortement recommandé d'ajouter des animaux supplémentaires afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux traités et 10 animaux témoins.

4.2. Niveaux de dose

14. La concentration du produit chimique testé utilisée pour chaque exposition inductrice doit être bien tolérée par l'organisme et doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition déclenchante doit être la concentration maximale non irritante. Les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'une étude pilote qui utilise deux ou trois animaux. Il conviendrait d'utiliser pour cette étude des animaux traités à l'ACF.

4.3. Induction : Injections Intradermiques

Jour 0 - groupe traité

15. Trois paires d'injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml sont effectuées dans la région de l'épaule préalablement débarrassée de ses poils, de telle sorte qu'une injection de chaque paire se situe de chaque côté de la ligne médiane du corps.

- Injection 1 : mélange 1:1 (v/v) d'ACF et d'eau ou de sérum physiologique
- Injection 2 : produit chimique testé dans un véhicule approprié à la concentration choisie
- Injection 3 : produit chimique testé à la concentration choisie dans un mélange 1:1 (v/v) d'ACF et d'eau ou de sérum physiologique

16. Pour l'injection 3, les produits chimiques hydrosolubles sont dissous dans la phase aqueuse avant d'être mélangés à l'ACF. Les produits chimiques liposolubles ou insolubles dans l'eau sont mis en suspension dans l'ACF avant d'être mélangés à la phase aqueuse. La concentration du produit chimique testé devra être égale à celle utilisée dans l'injection 2.

17. Les injections 1 et 2 sont faites à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 est effectuée vers la partie caudale de la surface d'essai.

Jour 0 - groupe témoin

18. Trois paires d'injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml sont effectuées aux mêmes endroits que pour les animaux traités.

- Injection 1 : mélange 1:1 (v/v) d'ACF et d'eau ou de sérum physiologique
- Injection 2: véhicule non dilué
- Injection 3 : 50 % de véhicule (p/v) dans un mélange 1:1 (v/v) d'ACF et d'eau ou de sérum physiologique.

4.4. Induction : Application Topique

Jour 5-7 - groupe traité et groupe témoin

19. Environ 24 heures avant l'application topique inductrice, si le produit chimique testé n'est pas un irritant cutané, la zone d'essai, après avoir été tondu à ras et/ou rasée, est badigeonnée de 0,5 ml de laurylsulfate de sodium à 10 pour cent dans la vaseline, afin de provoquer une irritation locale.

Jour 6-8 - groupe traité

20. La zone d'essai est de nouveau débarrassée de ses poils. Un papier filtre (2x4 cm) est complètement imprégné de produit chimique testé dans un véhicule approprié. Il est appliqué sur la zone d'essai et maintenu au contact de la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif. Le choix du véhicule doit être justifié. Les solides sont finement pulvérisés et incorporés dans un véhicule approprié. Les liquides peuvent être appliqués à l'état pur, si nécessaire.

Jour 6-8 - groupe témoin

21. La zone d'essai est de nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué selon la même méthode sur la zone d'essai et il est maintenu au contact de la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

4.5. Déclenchement : Application Topique

Jour 20-22 - groupe traité et groupe témoin

22. Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Un timbre ou une cupule chargé de produit chimique testé est appliqué sur l'un des flancs des animaux. S'il y a lieu, on peut également appliquer un timbre ou une cupule chargé uniquement du véhicule. Les timbres sont maintenus au contact de la peau pendant 24 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

4.6. Observations - groupe traité et groupe témoin

- 23.
- environ 21 heures après l'enlèvement du timbre, la zone de déclenchement est nettoyée et tondu à ras et/ou rasée ou épilée si nécessaire ;
 - environ trois heures plus tard (soit 48 heures après le début de l'application déclenchante), on observe et on cote la réaction cutanée selon l'échelle indiquée ci-dessous ;
 - environ 24 heures plus tard, on fait une seconde observation (à 72 heures) et la réaction est encore une fois cotée.

- Il est souhaitable que l'observation des animaux d'essai et des animaux témoins s'effectue en aveugle.

Tableau 1. Cotation de magnusson et Kligman pour l'évaluation des réactions a un essai de déclenchement par contact

0	pas de modification visible
1	érythème discret ou en taches
2	érythème modéré et confluent
3	érythème intense et tuméfaction

4.7. Répétition du déclenchement

24. S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors du premier déclenchement, il y a lieu d'en prévoir un second (c'est-à-dire une répétition du déclenchement), si nécessaire avec un nouveau groupe témoin, une semaine environ après le premier. Ce nouvel essai peut également être effectué sur le groupe témoin de départ.

4.8. Observations cliniques

25. Toutes les réactions cutanées et toutes les constatations inhabituelles, y compris les réactions de l'organisme, liées aux opérations d'induction et de déclenchement doivent être observées et enregistrées. D'autres techniques, par exemple un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané, peuvent être utilisées pour clarifier des réactions douteuses.

5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DE BUEHLER

5.1. Nombre d'animaux

26. On utilise un minimum de 20 animaux dans le groupe traité et au moins 10 dans le groupe témoin.

5.2. Niveaux de dose

27. La concentration de produit chimique testé utilisée pour chaque exposition inductrice doit être la concentration maximale entraînant une légère irritation. La concentration utilisée pour l'exposition déclenchante doit être la concentration maximale non irritante. La concentration appropriée peut être déterminée à partir d'une étude pilote qui utilise deux ou trois animaux.

28. Pour les produits d'essai hydrosolubles, il est judicieux d'utiliser comme véhicule de l'eau ou une solution diluée non irritante de substance tensio-active. Pour les autres produits d'essai, on préfère un mélange 80% d'éthanol/eau pour l'induction et de l'acétone pour le déclenchement.

5.3. Induction : Application Topique

Jour 0 - groupe traité

29. Un flanc est dégagé de ses poils (tondu à ras). Le timbre d'essai doit être complètement imbibé de produit chimique testé dans un véhicule approprié (le choix de ce véhicule doit être justifié ; les produits chimiques testés liquides peuvent être appliqués non dilués si nécessaire). Le timbre d'essai est appliqué sur la zone d'essai et est maintenu au contact de la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié.

30. Le timbre d'essai doit être occlusif. Pour ce faire, un tampon de coton est approprié ; celui-ci peut être rond ou carré, mais il doit mesurer environ de 4 à 6 cm². Pour assurer l'occlusion, il est préférable d'utiliser un dispositif de contention approprié. Si on emploie des bandages, d'autres expositions peuvent s'avérer nécessaires.

Jour 0 - groupe témoin

31. Un flanc est dégagé de ses poils (tondu à ras). Le véhicule seul est appliqué de la même manière que pour le groupe traité. Le timbre d'essai est maintenu au contact de la peau pendant 6 heures, à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié. Si on peut montrer qu'un groupe témoin recevant un traitement identique, exceptée le produit chimique testé, n'est pas nécessaire, on peut utiliser un groupe témoin sans aucun traitement.

Jour 6-8 et 13-15 - groupe traité et groupe témoin

32. Entre les jours 6 et 8 et de nouveau entre les jours 13 et 15, on effectue la même application qu'au jour 0 sur la même zone d'essai (débarrassée de ses poils, si nécessaire) du même flanc.

5.4. Déclenchement

Jour 27-29 - groupe traité et groupe témoin

33. Le flanc non traité des animaux d'essai et témoins est débarrassé de ses poils (tondu à ras). Un timbre occlusif ou une cupule contenant la quantité appropriée de substance d'essai (à la concentration maximale non irritante) est appliqué sur la partie postérieure du flanc non traité des animaux d'essai et témoins. S'il y a lieu, on applique également un timbre occlusif ou une cupule contenant uniquement le véhicule sur la partie antérieure du flanc non traité des animaux d'essai et témoins. Les timbres ou cupules sont maintenus au contact de la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement approprié.

5.5. Observations - groupe traité et groupe témoin

- 34.
- environ 21 heures après l'enlèvement du timbre, la zone de déclenchement est débarrassée de ses poils ;
 - environ trois heures plus tard (soit 30 heures après l'application du timbre de déclenchement), on observe et on cote les réactions cutanées selon l'échelle indiquée dans l'essai de maximisation sur le cobaye (voir paragraphe 23) ;
 - environ 24 heures après cette dernière observation (soit 54 heures après l'application du timbre de déclenchement), on observe et on cote de nouveau les réactions cutanées.

Il est souhaitable que l'observation des animaux d'essai et des animaux témoins s'effectue en aveugle.

5.6. Répétition du déclenchement

35. S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors du premier déclenchement, il y a lieu d'en prévoir un second (c'est-à-dire une répétition du déclenchement), si nécessaire avec un nouveau groupe témoin, une semaine environ après le premier. Ce nouvel essai peut également être effectué sur le groupe témoin de départ.

5.7. Observations cliniques

36. Toutes les réactions cutanées et toutes les constatations inhabituelles, y compris les réactions de l'organisme, liées aux opérations d'induction et de déclenchement doivent être observées et enregistrées. D'autres techniques, par exemple un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané, peuvent être utilisées pour clarifier des réactions douteuses.

6. RÉSULTATS ET RAPPORT (Méthode de maximisation sur le cobaye et la méthode de Buehler)

6.1. Résultats

37. Les résultats doivent être rassemblés dans un tableau indiquant, pour chaque animal, les réactions cutanées lors de chaque observation.

6.2. Rapport d'essai

38. Le rapport d'essai doit contenir les renseignements suivants :

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, 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 ou de la substance de contrôle 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;
- Concentrations testées ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Véhicule :

- justification du choix du véhicule (pureté, concentration si nécessaire ; volume utilisé).

Animaux d'essai :

- souche de cobaye utilisée ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc. ;
- poids de chacun des animaux au début et à la fin de l'essai.
- Conditions d'essai :
 - technique de préparation du site d'application ;
 - précisions sur les matériaux et les techniques utilisés pour l'application ;
 - justification du choix du niveau de dose (induction et déclenchement), y compris les résultats de l'étude pilote avec les conclusions sur les concentrations d'induction et de déclenchement à utiliser dans l'essai ;
 - précisions sur le mode d'application du produit chimique testé;
 - concentrations du véhicule et du produit chimique testé utilisées pour les expositions d'induction et de déclenchement et quantité totale de produit chimique appliqué lors de l'induction et du déclenchement.
- Détails sur le traitement et le calendrier de prélèvement ;
- Méthode d'évaluation de la toxicité ;
- Critère pour considérer l'étude comme positive ou négative ;
- Détails sur toute déviation au protocole et explication de la manière dont cette déviation a pu affecter la conception de l'essai et les résultats ;

Vérification de la fiabilité :

- résumé des résultats de l'étude de fiabilité la plus récente, comprenant des renseignements sur la substance, la concentration et le véhicule utilisés ; et la qualité de l'eau (y compris le type de régime alimentaire et la source, la source d'eau) ;

Résultats :

- sur chaque animal, comprenant le système de notation ;
- description détaillée de la nature et du degré des effets observés ;
- tout résultat d'histopathologie ; analyses statistiques s'il y a lieu.

Discussion des résultats :

Si un essai de dépistage est réalisé avant l'essai sur le cobaye, on doit fournir des précisions sur la méthode utilisée, comprenant la description ou la référence de l'essai, ainsi que les résultats obtenus avec la substance d'essai et les substances de référence utilisées pour le test de fiabilité et le test de sensibilité.

7. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Magnusson B. and Kligman A.M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximisation test. *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268.
- (2) Magnusson B. and Kligman A.M. (1970). *Allergic Contact Dermatitis in the Guinea Pig*. Charles G. Thomas; Springfield, Illinois.
- (3) Magnusson B. (1980). Identification of contact sensitizers by animal assay. *Cont. Derm.*, 6, 46.
- (4) Magnusson B., Fregert S. and Wahlberg J. (1979). Determination of skin sensitization potential of chemicals. Predictive testing in guinea pigs. *Arbete och Hälsa*, 26(E).
- (5) Buehler E.V. (1965). Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.*, 91, 171.
- (6) Ritz H.L. and Buehler E.V. (1980). Procedure for conducting the guinea pig assay. *Current Concepts in Dermatology*, Drill V.A. and Lazar P. (eds), Academic Press, New York, N.Y., 25-40.
- (7) Modjtahedi B.S, Fotenbach C.R., Marsano J.G, Gandhi A.M, Staab R., Maibach H.I. (2011). Guinea pig sensitization assays: An experimental comparison of three methods *Cutaneous and Ocular Toxicology*, Vol.30 (2). <https://doi.org/10.3109/15569527.2010.544277>
- (8) Frankild S., Volund A., Wahlberg J.E., Andersen K.E. (2000). Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. *Acta Derm Venereol.* 2000 Jul-Aug;80(4):256-62. DOI: 10.1080/000155500750012126 (8)
Kimber I., Hilton J. and Botham P.A. (1990). Identification of contact allergens using the murine local lymph node assay: comparisons with the Buehler Occluded Patch Test in guinea pigs. *Journal of Applied Toxicology*, 10 (3), 173-180.
- (9) Basketter DA, Selbie E, Scholes EW, Lees D, Kimber I, Hilton J. and , Botham P.A. (1990). Identification of contact allergens using the murine PA. Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assay

ANNEXE A. DÉFINITIONS

La sensibilisation de la peau (eczéma allergique de contact) est une réaction cutanée de caractère immunologique au contact d'une substance. Chez l'homme, les effets peuvent se caractériser par un prurit, un érythème, un oedème, des papules, des vésicules, des bulles ou par une combinaison de ces différentes manifestations. Chez d'autres espèces, les réactions peuvent différer et seuls l'érythème et l'oedème sont observés.

Exposition d'induction : il s'agit d'une exposition expérimentale d'un sujet à une substance d'essai dans le but d'induire un état d'hypersensibilité.

Période d'induction : il s'agit d'une période d'au moins une semaine qui fait suite à une exposition d'induction et au cours de laquelle peut se créer un état d'hypersensibilité.

Exposition déclenchante : il s'agit d'une exposition expérimentale d'un sujet précédemment traité avec la substance d'essai, qui fait suite à une période d'induction et qui a pour but de déterminer si le sujet réagit d'une manière hypersensible.