



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

« **Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours** »

1. INTRODUCTION

- Connaissances requises

- Substance à tester solide ou liquide
- Identification chimique de la substance à tester
- Degré de pureté (impureté) de la substance à tester
- Caractéristiques de solubilité
- pH (le cas échéant)
- Stabilité, y compris la stabilité dans un véhicule quand on en utilise un
- Point de fusion/d'ébullition

- Documents de référence

Il n'existe pas de normes internationales à ce sujet.

2. MÉTHODE

A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE, APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI

Dans le cadre de l'estimation et de l'évaluation des propriétés toxiques d'une substance chimique, la détermination de la toxicité cutanée subchronique peut être effectuée après obtention des renseignements initiaux relatifs à la toxicité aiguë de la dite substance. Elle fournit des informations sur les risques potentiels pour la santé résultant d'expositions répétées, par voie cutanée, sur une période de temps limitée.

Les éléments pris en considération pour effectuer une étude de toxicité cutanée à doses répétées à 21 jours ou à 28 jours sont suffisamment semblables pour qu'une seule Ligne directrice s'applique aux deux durées d'essai. La principale différence réside dans le laps de temps sur lequel s'étend l'administration (indiqué dans le texte).

- Définitions

Dans un essai par voie cutanée, la dose est la quantité de substance à tester qui est appliquée sur la peau. La dose s'exprime en poids (g, mg) ou en poids de substance à tester par

« Toxicité Cutanée à Doses Répétées : Étude à 21/28 Jours »

unité de poids d'animal d'expérience (par exemple mg/kg)

Le niveau sans effet / le niveau sans effet toxique / le niveau sans effet néfaste est la dose maximum qui peut être utilisée dans une épreuve sans produire d'effets néfastes. Un niveau sans effet s'exprime en poids de substance administrée quotidiennement, par unité de poids de l'animal d'expérience (mg/kg).

La toxicité cumulative est l'effet néfaste de l'action prolongée de doses répétées de la substance à tester ou de l'augmentation de concentration de la dite substance ou de ses métabolites dans les tissus sensibles.

- Principe de la méthode

La substance à tester est administrée quotidiennement, à différentes de doses, sur la peau de plusieurs groupes d'animaux d'expérience à raison d'un niveau de dose par groupe et ce, pendant une période de 21/28 jours. Au cours de la période d'application de la substance, on observe journallement les animaux de manière à déceler toute manifestation éventuelle de toxicité. Les animaux qui meurent en cours de l'expérience sont autopsiés ; ceux qui restent en vie à l'issue de celle-ci sont sacrifiés et autopsiés.

B. MODE OPÉRATOIRE

- Préparations

Des jeunes animaux, adultes et sains, sont acclimatés aux conditions de laboratoire pendant au moins 5 jours avant l'essai. Ensuite les animaux sont choisis au hasard et répartis entre les groupes de traitement et de contrôle. Peu de temps avant l'essai, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux à tester est tondue. Le rasage peut être employé mais il doit être effectué environ 24 heures avant l'essai. Il est généralement nécessaire de répéter la tonte ou le rasage environ toutes les semaines. Lorsque la fourrure est rasée ou tondue, cette opération doit s'effectuer en évitant toute lésion de la peau qui pourrait entraîner une modification de sa perméabilité, sauf, si une telle lésion de la peau est requise dans le cadre du programme d'essai. La surface à dégager pour l'application de la substance à tester ne peut pas être inférieure à 10% de la surface du corps et le poids de l'animal doit être pris en compte dans l'évaluation de la zone à dégager et des dimensions de la surface à enduire. Si l'essai porte sur des solides qui peuvent être pulvérisés le cas échéant, la substance à tester sera humidifiée au moyen d'eau, ou au besoin, au moyen d'un véhicule approprié de façon à garantir un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

véhicule, son influence sur la pénétration de la substance dans la peau doit être prise en considération. Les substances liquides sont généralement appliquées à l'état non dilué.

- Animaux d'expérience

Choix des espèces

Le rat adulte, le lapin ou le cochon d'Inde peuvent être utilisés. D'autres espèces peuvent être employées mais leur utilisation nécessiterait une justification.

Pour disposer au début de l'épreuve d'animaux ayant une taille qui facilite la conduite de l'essai, les gammes de poids suivantes sont suggérées :

rats 200 à 300 g ; lapins 2 à 3 kg ; cochons d'Inde 350 à 450 g.

Dans le cas où une étude à doses répétées par voie cutanée est effectuée en tant qu'essai préliminaire à une étude à long terme, il y a lieu d'utiliser la même espèce et la même souche dans les deux études.

Nombre et sexe

Au minimum 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) ayant une peau saine doivent être utilisés pour chaque niveau de dose. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux en cours d'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. De plus, un groupe satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut être traité à l'aide du plus haut niveau de dose pendant 21/28 jours et être ensuite soumis à une observation ayant trait au caractère réversible, à la persistance ou à l'apparition différée d'effets toxiques et ce, pendant une période de 14 jours après administration du traitement.

Conditions d'encagement et d'alimentation

Les animaux doivent être mis en cage individuellement. La température du local des animaux d'expérience doit être maintenue à 22°C ($\pm 3^\circ$) pour les rongeurs ou 20°C ($\pm 3^\circ$) pour les lapins et le taux d'humidité relative entre 30 et 70%. Lorsque l'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage doit être de 12 heures de clarté et de 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

• Conditions expérimentales

Niveaux de dose

Il faut utiliser au minimum trois niveaux de dose, un groupe témoin et le cas échéant, un groupe témoin pour le véhicule. Exception faite de l'exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même façon que les groupes d'essai. Le niveau de dose le plus élevé doit produire des effets toxiques sans toutefois atteindre un taux de mortalité qui empêcherait une évaluation valable de l'essai. Quant au niveau de dose le plus faible, il ne doit provoquer aucune manifestation de toxicité. Lorsqu'il existe une estimation utilisable du niveau d'exposition chez l'homme, le niveau de dose le plus faible doit être supérieur à celui de cette exposition. Idéalement, le(s) niveau(x) de dose intermédiaire doit(doivent) produire les plus faibles effets toxiques qu'il soit possible de discerner. Dans le cas où l'on utilise plus d'un niveau de dose intermédiaire, ces niveaux doivent être échelonnés de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés. Dans les groupes à niveaux de dose faible et intermédiaire ainsi que dans les groupes témoins, le taux de mortalité doit être faible afin de permettre une évaluation valable des résultats.

Si une application de la substance à tester produit une grave irritation de la peau, il faut réduire la concentration de la substance bien que cela puisse conduire à la diminution ou à la disparition d'autres effets toxiques au niveau de dose le plus élevé. Toutefois, si la peau a été gravement endommagée au début de l'étude, il peut s'avérer nécessaire de mettre fin à celle-ci et d'entreprendre une nouvelle étude avec des concentrations plus faibles.

Essai-limite

Si un essai effectué avec un seul niveau de dose d'au moins 1000 mg/kg de poids corporel (l'exposition probable chez l'homme pouvant toutefois mettre en évidence la nécessité d'utiliser un niveau de dose plus élevé) en appliquant les procédures décrites pour cette étude n'entraîne aucun effet toxique observable et si la possibilité d'une action toxique peut être écartée compte tenu des données relatives aux substances structurellement apparentées, il peut alors s'avérer inutile de procéder à une étude complète avec trois niveaux de doses.

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

Observations

Un examen clinique attentif doit être pratiqué au moins une fois par jour. Des observations complémentaires sont à effectuer quotidiennement et doivent s'accompagner de mesures appropriées visant à réduire au minimum le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple autopsie ou réfrigération des animaux trouvés morts, isolement ou sacrifice des animaux affaiblis ou moribonds.

- Exécution de l'essai

Les animaux sont mis en contact avec la substance à tester, idéalement pendant au moins 6 heures par jour, à raison de 7 jours par semaine, pendant une période de 21/28 jours. Toutefois, pour des raisons essentiellement pratiques, une application à raison de 5 jours par semaine est considérée comme acceptable. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures doivent être gardés pendant une période complémentaire de 14 jours sans traitement pour contrôler la disparition ou la persistance des effets toxiques.

La substance à tester doit être appliquée de façon uniforme sur une surface représentant environ 10% de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être moindre mais la pellicule doit être aussi mince et aussi uniforme que possible.

Entre les différentes applications, la substance à tester doit être maintenue en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant. Le site de l'essai doit être ensuite couvert de manière à maintenir le pansement gaze et la substance, et à éviter que les animaux puissent ingérer la dite substance. Des appareils de contention peuvent être employés pour empêcher l'ingestion de la substance à tester, mais une immobilisation totale n'est pas à recommander.

Les signes de toxicité doivent être enregistrés tels qu'ils sont observés, ainsi que le moment d'apparition, le degré, et la durée de ces manifestations. Les observations pendant l'épreuve doivent comprendre, sans toutefois s'y limiter, les changements apparaissant sur la peau et la fourrure, dans les yeux et les muqueuses ainsi que dans les systèmes respiratoire et circulatoire, dans les systèmes nerveux central et autonome et enfin, dans l'activité somatomotrice et dans les manifestations comportementales. Sur une base hebdomadaire, il y a lieu de mesurer la quantité de nourriture consommée et de peser les animaux. Une observation régulière des animaux est nécessaire pour

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

s'assurer qu'il n'y ait pas de perte d'animaux en cours d'étude en raison de causes telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. Dans les groupes de traitement, à l'exception des groupes satellites, tous les animaux qui survivent sont sacrifiés au terme de l'épreuve. Lorsque l'on constate la présence d'animaux moribonds, il y a lieu de les écarter et de les sacrifier.

• Examens cliniques

Les examens qui suivent doivent être effectués sur tous les animaux :

- (a) Au terme de la période d'essai, il y a lieu d'effectuer les examens suivants : hématologie, y compris l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le comptage des érythrocytes, la numération-formule sanguine ainsi qu'une détermination du potentiel de coagulation telle que le temps de coagulation, le temps de prothrombine, le temps de thromboplastine ou le comptage des plaquettes.
- (b) Des analyses biochimiques cliniques du sang doivent être effectuées à la fin de la période d'essai. Les paramètres sanguins des fonctions hépatique et rénale conviennent à cet effet. Le choix de tests particuliers dépendra des observations concernant le mode d'action de la substance. Les déterminations suggérées sont les suivantes : calcium, phosphore, chlore, sodium, potassium, glycémie à jeun (avec période de jeûne adaptée à l'espèce), transaminase glutamo-pyruvique sérique*, transaminase glutamo-oxaloacétique sérique**, ornithine décarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, azote uréique, albumine, créatinine du sang, bilirubine totale et protéines sériques totales. Parmi les autres déterminations pouvant s'avérer nécessaires pour une évaluation toxicologique appropriée figurent l'analyse des lipides, des hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine et l'activité cholinestérasique. Le cas échéant, des analyses biochimiques cliniques complémentaires peuvent être effectuées en vue d'approfondir l'étude des effets observés.

* Connue à présent sous le nom d'alanine aminotransferase sérique.

** Connue à présent sous le nom d'aspartate aminotransferase sérique.

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

- (c) Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais uniquement si la toxicité probable ou observée en indique le besoin.

Dans le cas où les données de base historiques ne sont pas adéquates, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres de biochimie hématologique et clinique, avant d'administrer la substance à tester.

- Anatomo-pathologie

Autopsie générale

Dans la présente étude, tous les animaux doivent être soumis à une autopsie générale complète qui comportera l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices, des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Le foie, les reins, les capsules surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide, dès que possible après dissection, pour éviter leur dessiccation. Les organes et tissus suivants doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'un éventuel examen histopathologique ultérieur : peau normale et peau traitée, foie, reins et organes cibles, c'est-à-dire ceux qui présentent des lésions macroscopiques ou des changements de taille.

Histopathologie

Un examen histopathologique doit être effectué sur les organes et tissus conservés provenant du groupe exposé au plus haut niveau de dose et du groupe de contrôle. Ces examens peuvent être étendus à des animaux d'autres groupes d'exposition, si on trouve nécessaire d'étudier les changements constatés dans le groupe exposé au plus haut niveau de dose. Les animaux qui appartiennent au groupe satellite doivent être soumis à un examen histologique portant particulièrement sur les organes et les tissus qui ont laissé apparaître des effets dans les autres groupes de traitement.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

- Traitement des résultats

Les données peuvent être résumées sous la forme de tableaux faisant apparaître pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux montrant des lésions, le type des lésions et le pourcentage d'animaux affectés par chaque type de lésion.

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

Tous les résultats observés d'une manière quantitative ou fortuite, doivent être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée ; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

- Evaluation des résultats

Les résultats d'une étude de toxicité cutanée à doses répétées doivent être interprétés en fonction des effets toxiques observés, des résultats d'autopsie et des résultats histopathologiques. L'évaluation comportera le rapport entre, d'une part, le niveau de dose de la substance à tester et d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les anomalies comportementales et cliniques, les lésions graves, les organes cibles identifiés, les changements de poids corporel, les effets sur le taux de mortalité et tout autre effet toxique général ou spécifique. Une étude de 21/28 jours correctement menée fournira des renseignements sur les effets de l'application répétée d'une substance par voie cutanée et pourra démontrer la nécessité d'études complémentaires à plus long terme. Elle peut également fournir des informations sur le choix des niveaux de dose dans le cas d'études à plus long terme.

- Rapport

Le rapport d'essai doit contenir les renseignements suivants :

- espèce, souche utilisée ;
- données des effets toxiques par sexe et par niveau de dose ;
- moment de la mort au cours de l'étude ou nombre d'animaux ayant survécu au terme de cette étude ;
- effets toxiques ou autres ;
- moment de l'observation de chaque manifestation anormale et son évolution ultérieure ;
- données relatives à la nourriture et au poids corporel ;
- essais hématologiques effectués et résultats avec données de base relatives ;
- essais biochimiques cliniques effectués et résultats avec données de base relatives ;

**« Toxicité Cutanée à Doses Répétées :
Étude à 21/28 Jours »**

- résultats d'autopsie ;
- une description détaillée de tous les résultats histopathologiques ; et
- si possible, traitement statistique des résultats.

- Interprétation des résultats

Une étude de toxicité cutanée à doses répétées fournit des renseignements sur les effets d'une exposition répétée de la peau à une substance. L'extrapolation à l'homme des résultats de l'étude est valable dans une mesure limitée, mais elle peut donner des indications utiles sur le degré d'absorption percutanée d'une substance.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. WHO Publication : Environmental Health Criteria No. 6, *Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals*. Part I Geneva, 1978.
2. United States National Academy of Sciences, Committee for the Revision of NAS Publication 1138, *Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances*. Washington, 1977.
3. Draize, J.H., *The Appraisal of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics*, 26-30. Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, Texas, 1959.
4. Hagan, E.G., *Appraisal of the Safety of Chemicals. Appraisal of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics*, 17-25. Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas, 1965.