



Section 4
Effets sur la santé

Essai n° 442D: Sensibilisation cutanée *in vitro*

Essais de sensibilisation cutanée in vitro portant sur l'événement clé relatif à l'activation des kératinocytes dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables

25 juin 2024

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



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

Essais de sensibilisation cutanée *in vitro* portant sur l'événement clé relatif à l'activation des kératinocytes dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ligne directrice pour un essai fondé sur l'événement clé relatif à l'activation des kératinocytes

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). 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. 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). 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. Le quatrième événement clé est la prolifération des lymphocytes T.

2. La présente Ligne directrice (LD) décrit les essais *in vitro* portant sur les mécanismes du deuxième événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée, à savoir l'activation des kératinocytes (2). Cette LD comprend des méthodes d'essai utilisées pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH de l'ONU (1). Elle décrit actuellement trois méthodes d'essai, parmi lesquelles deux méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase *in vitro* et une méthode d'essai fondée sur la quantification de l'expression génique :

- la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase KeratinoSens™ (appendice IA) ;
- la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase LuSens (appendice IB) ;
- la méthode d'essai de sensibilisation cutanée EpiSensA (appendice IC).

© OCDE (2024)

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

3. Ces trois méthodes d'essai sont jugées valides sur le plan scientifique. La méthode d'essai KeratinoSens™ a d'abord fait l'objet d'une étude de validation suivie d'un examen par des pairs indépendant réalisé par le Comité scientifique consultatif (ESAC) du Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la validation de méthodes alternatives (EURL ECVAM). L'EURL ECVAM ayant formulé des recommandations positives, la méthode KeratinoSens™ est considérée comme la méthode de référence validée (MRV) en ce qui concerne les méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase (3) (4) (5) (6). La méthode d'essai LuSens a été soumise à une étude de validation axée sur les normes de performance, à l'issue de laquelle elle a été examinée par l'ESAC qui a émis un avis positif (7) (8) (9) (10). La méthode EpiSensA a fait l'objet d'études de validation (11) suivies d'un examen indépendant par des pairs (12) réalisé par le Centre japonais pour la validation des méthodes de substitution (JaCVAM). Elle est considérée comme une MRV en ce qui concerne les méthodes d'essai quantifiant les modifications de l'expression des gènes marqueurs associés à l'activation des kératinocytes (*ATF3*, *IL-8*, *GCLM* et *DNAJB4*) au moyen de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative après transcription inverse sur des modèles d'épiderme humain reconstitué (EhR). Il existe aussi un ensemble de normes de performance (13) pour ce type de méthode afin de faciliter la validation et l'évaluation de méthodes d'essai sur EhR similaires ou modifiées.

Rappel des faits et principes relatifs aux méthodes d'essai incluses dans les lignes directrices fondées sur les événements clés

4. Historiquement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques qui utilisent un cobaye – le test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et le test de Buehler (LD 406 de l'OCDE) (14) – portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Les essais chez la souris – l'ELGL (LD 429 de l'OCDE) (15) et ses trois variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL : DA (LD 442A de l'OCDE) (16) ainsi que l'ELGL : BrdU-ELISA et BrdU-FCM (LD 442B de l'OCDE) (17) – reposent tous exclusivement sur l'induction obtenue en réponse. Ces essais se sont imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux essais sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

5. Les méthodes mécanistiques d'essai in chemico et in vitro dont le mécanisme porte sur les trois premiers événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée ont été adoptées afin d'aider à évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques : la LD 442C de l'OCDE décrit l'essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (18) et porte sur le premier événement clé ; la présente LD évalue l'activation des kératinocytes correspondant au deuxième événement clé, tandis que la LD 442E de l'OCDE s'intéresse à l'activation des cellules dendritiques, troisième événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée (19). Enfin, le quatrième événement clé, qui se traduit par la prolifération des lymphocytes T, est évalué indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (15). Il convient de noter qu'il n'est pas nécessaire d'évaluer tous les événements clés pour établir une classification relative à la sensibilisation cutanée.

6. Dans la mesure où l'activation des kératinocytes n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée (2) (20), les informations fournies par les méthodes d'essai mises au point pour étudier cet événement clé peuvent ne pas suffire à elles seules pour conclure à l'absence de pouvoir de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Par conséquent, les données obtenues avec les méthodes d'essai décrites dans la présente LD sont proposées pour aider à distinguer les sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) des non-sensibilisants dans le cadre d'une approche intégrée (IATA), aux côtés d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais in vitro portant sur d'autres événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (read-across) relatives à des produits chimiques similaires (20). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données obtenues avec ces méthodes suivant des

approches définies, c'est-à-dire des approches normalisées au regard des sources d'information et des procédures employées à des fins de prédiction (20). Des scénarios d'utilisation de ces données figurent dans une LD de l'OCDE sur les approches définies pour la sensibilisation cutanée (21). Si l'intention est d'utiliser les données de ces méthodes dans une approche définie pour la sensibilisation cutanée, il convient de se référer à la ligne directrice 497 pour l'application des critères de valeurs limites ou d'autres procédures d'interprétation des données (21). Pour plus de détails sur l'application des critères de valeurs limites, voir l'annexe IA, figure 1.

7. Les méthodes d'essai décrites dans cette LD ne peuvent pas être utilisées seules, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH (1) par les autorités chargées d'appliquer ces deux sous-catégories optionnelles, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, des résultats positifs avec ces méthodes peuvent être considérés comme suffisants à eux seuls pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH.

8. Les méthodes d'essai décrites dans la présente Ligne directrice peuvent différer quant aux procédures, au domaine d'application et aux limitations, mais chacune d'elles peut être utilisée pour satisfaire aux exigences des pays en matière de résultats d'essais portant sur l'événement clé relatif à l'activation des kératinocytes dans l'AOP sensibilisation cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données. Dans le contexte des Approches Définies (AD), les méthodes ne sont pas automatiquement interchangeables ; la LD 497 précise quelles méthodes ou combinaisons de méthodes il convient d'utiliser.

9. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est soumis à l'essai et ne fait pas référence à l'applicabilité des méthodes d'essai pour les substances mono-constituant, les substances multi-constituants et/ou les mélanges. Lorsque l'essai se déroule en culture submergée, il convient d'établir au préalable si le produit chimique à tester se dissout dans le milieu d'exposition ou s'il forme au moins une dispersion stable (par exemple au moyen d'une inspection visuelle afin de s'assurer qu'à la concentration finale maximale de l'essai, le produit chimique est dissous/dispersé dans le milieu d'exposition, et qu'on n'observe ni résidus non dissous, ni formation d'un précipité, ni déphasage quand la préparation est laissée à reposer pendant plusieurs heures).

10. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité des méthodes d'essai à des substances multi-constituants ou à des mélanges (18) (19) (20). Même si elles n'ont pas été évaluées dans le cadre d'études de validation, les méthodes d'essai peuvent être techniquement applicables aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques et substances difficile à tester (parce qu'instable par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables. De plus, en cas d'essais portant sur des substances multi-constituants ou des mélanges, il faut prendre en considération l'interférence possible des constituants cytotoxiques avec les réponses observées (par exemple, la présence d'une forte teneur de constituants cytotoxiques non sensibilisants peut masquer la réponse des sensibilisants faibles ou des sensibilisants présents à faible concentration). Selon les cas, il peut être scientifiquement justifié de tester soit les principaux constituants formant la fraction principale isolément, soit plusieurs fractions du mélange pour établir le potentiel de sensibilisation d'un mélange complexe.

Bibliographie

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. 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) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- 4) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- 5) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
- 6) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation].
- 7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28, 1482-1497.
- 8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burlison F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 32, 278-286.
- 9) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf].
- 10) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 11) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 12) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- 13) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 14) OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 15) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, 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 (2018). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 18) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 19) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 20) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/MONO\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iataass>].
- 21) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- 22) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- 23) Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization in vitro test strategy. *Toxicology Letters* 221, S204.
- 24) Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. *Regul Toxicol Pharmacol*; 72(2):350-60.

ANNEXE A. DÉFINITIONS

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).

ARE (Antioxidant Response Element) : l'élément de réponse antioxydant (aussi appelé EpRE, élément de réponse électrophile) est un élément de réponse présent dans la région promotrice amont de nombreux gènes cytoprotecteurs et gènes de phase II. Lorsqu'il est activé par le facteur Nrf2, il médie l'induction transcriptionnelle de ces gènes.

CE1.5 : concentration, établie par interpolation, à laquelle l'induction de l'activité de la luciférase est multipliée par 1.5.

CI30 : concentration à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 30 %.

CI50 : concentration à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 50%.

Coefficient de variation : mesure de la variabilité calculée pour un groupe de données issues de réplicats en divisant l'écart-type par la moyenne. Cette mesure peut être multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage.

CV75 : concentration estimée correspondant à une viabilité cellulaire de 75 %.

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.

Exempt de matériel xénogénique : qui ne comporte aucun élément provenant d'une autre espèce que celle dont sont issues les cellules utilisées dans l'essai, en l'occurrence l'être humain.

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 (3).

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, approche intégrée en matière d'essais et d'évaluation) : approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'étayer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

Imax : valeur maximale du facteur d'induction de l'activité de la luciférase relativement à l'induction obtenue avec le témoin de solvant (négatif), à toute concentration du produit chimique testé.

Facteur d'induction de l'activité de la luciférase : rapport entre la luminescence des cellules traitées (moins le blanc) et la luminescence des cellules exposées au témoin de solvant/véhicule concomitant (moins le blanc).

Keap1 : Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) est une protéine détectrice pouvant réguler l'activité du facteur Nrf2. En conditions non induites, la protéine détectrice Keap1 cible le facteur

de transcription Nrf2 et provoque son ubiquitination et sa dégradation protéolytique dans le protéasome. En cas de modification covalente des résidus cystéine réactifs de Keap1 par des molécules de petite taille, Nrf2 peut se dissocier de Keap1 (4) (5) (6).

Mélange : mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles (1).

Méthode d'essai valide : méthode d'essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Une méthode d'essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (3).

Méthode de référence validée (MRV) : la ou les première(s) méthode(s) approuvée(s) comme scientifiquement valide(s) et utilisée(s) à titre de référence dans les études de validation axées sur la performance.

Normes de performance : normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : i) les éléments essentiels de la méthode d'essai ; ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée ; et iii) les niveaux de précision et de fiabilité, comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (3).

Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) : facteur de transcription intervenant dans la voie de réponse antioxydante. Lorsque Nrf2 n'est pas ubiquitiné, il se développe dans le cytoplasme et se transloque dans le noyau, où il se combine à l'ARE dans la région promotrice amont de nombreux gènes cytoprotecteurs, dont il initie la transcription (4) (5) (6).

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 (3).

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 (3).

Produit chimique testé : le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est soumis à l'essai.

Substances 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.

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.

Reproductibilité : accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur la même substance selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (3).

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 (3).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies) : système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

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 (3).

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.

Témoin de solvant/véhicule : réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique testé, mais comprenant le solvant utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique testé dissous dans le même solvant ou véhicule.

Témoin négatif : échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour ne pas induire de réponse positive du système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance testée et les autres échantillons témoins.

Témoin positif : échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité

de la réponse du témoin positif dans le temps, l'intensité maximale de la réponse positive ne doit pas être excessive.

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

VC : viabilité cellulaire

Références

- (1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- (2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. 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 (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (5) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (6) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.

Appendice IA : Sensibilisation cutanée in vitro : Méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase KeratinoSens™

REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

1. La méthode d'essai décrite dans le présent appendice à la Ligne directrice pour les essais 442D porte sur le deuxième événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée (1), à savoir l'activation des kératinocytes. Cette méthode fait appel à la luciférase pour évaluer l'activation des gènes dépendant de l'élément de réponse antioxydant (ARE) médiée par le facteur Nrf2. Plusieurs études ont montré que les sensibilisants cutanés provoquent l'induction de gènes régulés par l'ARE (2) (3). Des substances électrophiles de petite taille telles que les sensibilisants cutanés peuvent agir sur la protéine détectrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), par exemple par une modification covalente de son résidu cystéine l'amenant à se dissocier du facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Le facteur Nrf2 dissocié peut alors activer les gènes dépendant de l'ARE, tels que ceux qui codent les enzymes détoxifiantes de phase II (2) (4) (5).
2. La méthode d'essai in vitro ARE-Nrf2 luciférase KeratinoSens™ (ci-après désignée « méthode KeratinoSens™ ») a fait l'objet d'études de validation (3) (6) (7) suivies d'un examen indépendant par des pairs, conduit par le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (8). La méthode KeratinoSens™ a été considérée comme scientifiquement valide, dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins d'identification des dangers (8).
3. D'après l'ensemble des données issues de l'étude de validation et des tests pratiqués en interne lors de l'examen indépendant de la méthode d'essai par des pairs, la méthode KeratinoSens™ est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des techniques de culture cellulaire (8). Le niveau de reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires attendu des prédictions faites par la méthode KeratinoSens™ est de l'ordre de 85 % (8). Par ailleurs, en prenant en compte toutes les données soumises à l'EURL ECVAM pour l'évaluation et l'examen par des pairs et en les comparant aux résultats obtenus par la méthode ELGL, on a calculé la précision (77 % - 155/201), la sensibilité (78 % - 71/91) et la spécificité (76 % - 84/110) de la méthode KeratinoSens™ pour ce qui est de distinguer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH) des non-sensibilisants cutanés (8). Ces chiffres sont proches de ceux publiés à l'issue d'essais en interne portant sur quelque 145 substances chimiques (précision 77 %, sensibilité 79 %, spécificité 72 %) (7). Cette information atteste de l'utilité de la méthode KeratinoSens™ comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode KeratinoSens™ utilisée seule n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le cadre d'une approche définie ou d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale de la présente LD. En outre, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode KeratinoSens™ est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études in vivo) et propriétés physico-chimiques (3) (6) (7) (8). Elle est aussi applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable dans le milieu d'exposition (colloïde ou suspension dans lequel/laquelle le produit chimique testé ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant en formant plusieurs phases). Les produits chimiques qui ne remplissent pas ces conditions à la concentration finale maximale requise (2 000 µM) peuvent néanmoins être testés à des concentrations plus faibles. Dans ce cas, les résultats qui répondent aux critères de positivité peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané. Un résultat négatif obtenu pour une concentration maximale inférieure à 1 000 µM sans démonstration de cytotoxicité sera considéré comme non concluant (voir le modèle prédictif au paragraphe 32). Si le seuil de cytotoxicité (viabilité < 70 %) est atteint à une concentration d'essai maximale < 1 000 µM correspondant à la limite de solubilité du produit chimique testé, les critères de négativité demeurent applicables. D'une manière générale, les substances mono-constituant dont le LogP est supérieur à 7 peuvent être insolubles dans le milieu d'exposition. Cela étant, s'il est possible d'obtenir et de documenter des solutions ou des dispersions stables, les substances en question peuvent être testées.

5. Les résultats négatifs sont à interpréter avec prudence, car les substances réactives exclusivement vis-à-vis des résidus lysine peuvent être identifiées comme négatives par la méthode d'essai : en effet, le mécanisme clé d'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE semble reposer sur la réaction électrophile de facteurs de stress avec les thiols nucléophiles (groupements sulfhydryles de la cystéine) de la protéine Keap-1. L'obtention de données complémentaires livrées par des essais sur la réactivité peptidique peut contribuer à lever cette incertitude, en particulier les essais permettant de distinguer la réactivité de la cystéine et celle de la lysine. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (10), ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (produits chimiques nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (produits chimiques activés par auto-oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs. Toutefois, il a été montré que la majorité des pré-haptènes (produits chimiques activés par auto-oxydation) et des pro-haptènes (produits chimiques nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) sont suffisamment bien identifiés par une combinaison de méthodes d'essai visant les événements clés 1, 2 et 3 de l'AOP, si bien que les résultats négatifs peuvent généralement servir à étayer la classification (12) (20) (34). À l'inverse, les produits chimiques testés qui n'agissent pas comme des sensibilisants, mais sont néanmoins des facteurs de stress chimique, peuvent donner lieu à des faux positifs (8). Enfin, les produits chimiques testés qui interfèrent avec la luciférase peuvent créer un risque de confusion avec l'activité de la luciférase, dans les essais au niveau cellulaire, en provoquant soit une inhibition apparente soit une luminescence accrue (13). Ainsi, il a été signalé que des concentrations de phyto-œstrogènes supérieures à 1 µM interféraient avec les signaux de luminescence, dans d'autres essais avec gènes rapporteurs faisant intervenir la luciférase, du fait d'une suractivation du gène rapporteur de la luciférase (14). Il convient donc d'examiner attentivement l'expression de la luciférase obtenue à des concentrations élevées de phyto-œstrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur de la luciférase comparable à celle résultant des phyto-œstrogènes (14). Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode KeratinoSens™ ne peut s'appliquer à d'autres catégories spécifiques de substances, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester ces catégories.

6. Outre qu'elle aide à distinguer les sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) des non-sensibilisants, la méthode KeratinoSens™ fournit des informations sur la relation concentration-réponse susceptibles de contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation, dans le cadre d'une approche intégrée comme la démarche IATA (11) (15). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation de la méthode KeratinoSens™ combinée à d'autres sources d'information (7) (11) (16) (17) (18) (19). Certaines sources décrivent plus particulièrement l'utilisation de données dose-réponse fournies par la méthode KeratinoSens™ combinées à des données quantitatives de réactivité peptidique en vue de déterminer la puissance de sensibilisation dans le cadre de l'ELGL et d'essais sur l'homme (21), ou encore l'utilisation de données KeratinoSens™ pour des stratégies intégrées d'estimation de la puissance fondée sur l'ELGL et s'appuyant sur un modèle bayésien (11) (22). Une évaluation a par ailleurs été effectuée pour établir comment déterminer spécifiquement la puissance de sensibilisation chez l'homme (23). Enfin, d'autres sources présentent l'utilisation de la méthode KeratinoSens™ aux fins de l'évaluation de la puissance de certaines classes chimiques (21) (24).

7. Les termes sont définis dans l'annexe 1 de l'Introduction générale.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8 La méthode KeratinoSens™ fait appel à une lignée de cellules adhérentes immortalisées dérivées de kératinocytes d'origine humaine qui contiennent de façon stable un gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse antioxydant (ARE) du gène humain AKR1C2 (25). On sait que ce gène intensifie son expression sous l'effet de sensibilisants cutanés (26) (27). Cette lignée cellulaire comporte le gène de la luciférase sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur constitutif fusionné à l'ARE (25) (26). Le signal de la luciférase reflète l'activation par les sensibilisants de gènes endogènes dépendant du facteur Nrf2, et la dépendance du signal de la luciférase vis-à-vis de Nrf2 dans la lignée cellulaire recombinante a été démontrée (28). Cela permet la mesure quantitative (par détection de luminescence) de l'induction du gène de la luciférase, grâce à l'utilisation de substrats de luciférase produisant une luminescence satisfaisante, comme indicateur de l'activité du facteur de transcription Nrf2 dans les cellules après exposition à des produits chimiques testés électrophiles.

9 Dans la méthode KeratinoSens™, les produits chimiques testés sont considérés comme positifs s'ils provoquent une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase dépassant un seuil donné (c.à.d. ≥ 1.5 fois, soit 50 % d'augmentation), au-dessous d'une concentration donnée n'affectant pas significativement la viabilité de la cellule (au-dessous de 1 000 μM , par exemple, et à une concentration à laquelle la viabilité cellulaire reste supérieure à 70 %) (3) (6). On détermine à cet effet la valeur maximale (I_{max}) du facteur d'induction de l'activité de la luciférase dans l'échantillon par rapport à celle dans le témoin de solvant (négatif). De plus, les cellules étant exposées à une série de concentrations du produit chimique testé, la concentration nécessaire pour obtenir une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase au-delà du seuil (c.à.d. la valeur de CE1.5) devra être interpolée à partir de la courbe dose-réponse établie à partir des concentrations testées (voir paragraphe 26 pour la méthode de calcul). Enfin, des mesures de cytotoxicité devront être réalisées en parallèle pour déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase survient à des concentrations sub-cytotoxiques.

10. Avant d'utiliser en routine la méthode KeratinoSens™ conformément à la présente LD, les laboratoires devront apporter la preuve de leur compétence technique, en appliquant la méthode aux dix substances listées à l'annexe 1 de cet appendice.

11. Des normes de performance (29) ont été établies pour faciliter la validation de méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase in vitro nouvelles ou modifiées similaires à la MRV KeratinoSens™, et permettre de modifier rapidement la présente LD afin de les y intégrer. L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie que pour les méthodes d'essai validées conformément aux normes de performance, si ces méthodes ont été examinées et intégrées à la présente Ligne directrice par l'OCDE.

MODE OPÉRATOIRE

12. Un protocole DB-ALM est disponible pour la méthode KeratinoSens™, et il convient de l'appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai en laboratoire (9). Les laboratoires qui appliquent cette méthode d'essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante utilisée dans la méthode KeratinoSens™ en signant avec le développeur de la méthode un accord type prévoyant l'octroi d'une licence autorisant l'utilisation commerciale du gène luciférase. L'essai fondé sur le gène rapporteur de la luciférase est aussi protégé par une licence d'utilisation limitée Promega en vertu de laquelle le laboratoire doit faire appel aux réactifs pour essai de luminescence commercialisés par Promega. On trouvera dans les paragraphes qui suivent une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode KeratinoSens™. En outre, l'annexe 2 de l'appendice décrit comment adapter la méthode KeratinoSens™ à des conditions de culture exemptes de matériel xénogénique grâce à des réactifs d'origine humaine (33). Il est cependant conseillé de consulter les autorités réglementaires appropriées avant de décider du type de sérum à employer dans la méthode d'essai KeratinoSens™.

Préparation des cultures de kératinocytes

13. Il convient d'utiliser la lignée de cellules transgéniques KeratinoSens™ comportant une insertion stable du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'ARE. À réception, les cellules KeratinoSens™ sont multipliées conformément au protocole de la méthode d'essai (2 à 4 repiquages, par exemple) afin de former un stock homogène que l'on conservera à l'état congelé. Les cellules issues de ce stock d'origine peuvent subir jusqu'à 25 repiquages maximum, et servent aux essais de routine dans le milieu d'entretien/de croissance (milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant du sérum et de la généticine pour conserver le gène), conformément au protocole DB-ALM pour cette méthode d'essai (9).

14. Pour les essais, les cellules doivent présenter une confluence de 80-90 %, et il convient de veiller à ce qu'elles n'arrivent jamais à confluence complète. Une journée avant l'essai, les cellules sont récoltées et réparties dans des plaques 96 puits selon une densité égale à 10 000 cellules/puits. On veillera à éviter la sédimentation des cellules durant l'ensemencement, afin d'assurer une distribution homogène du nombre de cellules entre les puits. Si ce n'est pas le cas, cette étape peut donner lieu à une forte variabilité entre puits. Pour chaque répétition, trois réplicats sont utilisés pour mesurer l'activité de la luciférase, et au moins un réplicat parallèle est utilisé pour le test de viabilité cellulaire.

Préparation du produit chimique testé et des substances témoins

15. Le produit chimique testé et les substances témoins sont préparés le jour de l'essai. Les produits chimiques testés sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, no CAS 67-68-5, pureté

≥ 99 %) jusqu'à la concentration finale souhaitée (200 mM, par exemple). Les solutions de DMSO peuvent être considérées comme auto-stérilisantes, si bien qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une filtration stérile. Les produits chimiques testés qui ne sont pas solubles dans le DMSO sont dissous dans de l'eau stérile ou le milieu de culture, et les solutions sont stérilisées, par exemple par filtration. Lorsque la masse moléculaire du produit chimique testé n'est pas définie, une solution-mère est préparée à une concentration par défaut de 40 mg/ml ou 4 % (m/v). Si des solvants autres que le DMSO, l'eau ou le milieu de culture sont utilisés, il convient de fournir une justification scientifique adéquate.

16. À partir des solutions-mères du produit chimique testé, des dilutions en série sont préparées avec du DMSO ou un autre solvant adapté (eau stérile ou milieu de culture) pour obtenir 12 concentrations de référence (de 0.098 à 200 mM). Indépendamment du solvant utilisé, les concentrations de référence sont ensuite diluées 25 fois dans un milieu de culture contenant du sérum, et utilisées finalement pour le traitement après une nouvelle dilution d'un facteur 4, si bien que les concentrations finales du produit chimique testé vont de 0.98 à 2 000 µM (sur la base d'un facteur de dilution égal à 2). Il est possible d'utiliser d'autres concentrations si cela est justifié (dans le cas d'un produit cytotoxique ou peu soluble, par exemple). Quand la masse moléculaire d'un produit chimique testé n'est pas définie, une série de dilutions est réalisée avec du DMSO ou un autre solvant adapté jusqu'à obtenir les concentrations finales attendues (12 concentrations allant de 0.196 à 400 µg/ml, par exemple).

17. Un témoin de solvant/véhicule concomitant (en l'occurrence le DMSO) sera testé dans chaque répétition, et le nombre suffisant de puits (six) sera préparé à cet effet sur chaque plaque. Le témoin de solvant/véhicule est soumis aux mêmes dilutions que celles décrites au paragraphe 16 pour les concentrations de référence, de telle sorte que la concentration finale du témoin de solvant/véhicule est de 1 %, valeur dont on sait qu'elle n'affecte pas la viabilité cellulaire (soit la même concentration de DMSO que dans le produit chimique testé et dans le témoin positif). Si le produit chimique testé n'est pas soluble dans le DMSO et a été dilué dans l'eau, la concentration de DMSO dans tous les puits de la solution d'essai finale doit être ajustée à 1 %, comme pour les autres produits chimiques testés et substances témoins. Dans la méthode KeratinoSens™, le témoin de solvant/véhicule (DMSO) a également valeur de témoin négatif.

18. Chaque répétition doit inclure un nombre suffisant de puits contenant un témoin positif concomitant, conformément au protocole DB-ALM (9), afin de montrer que le système d'essai aboutit à la réponse attendue. À titre d'exemple, pour chaque réplicat, la méthode KeratinoSens™ fait appel à cinq concentrations d'aldéhyde cinnamique (no CAS 14371-10-9, pureté ≥ 98 %) découlant de cinq concentrations de référence allant de 0.4 à 6.4 mM préparées dans le DMSO (à partir d'une solution-mère à 6.4 mM) puis diluées selon la procédure indiquée au paragraphe 16 pour les concentrations de référence, si bien que la concentration finale du témoin positif se situe entre 4 et 64 µM. D'autres témoins positifs adéquats, donnant de préférence une CE1.5 située dans la fourchette des valeurs moyennes, peuvent être utilisés s'il existe des données historiques dont on peut tirer des critères d'acceptation issus de procédures comparables.

Application des produits chimiques testés et des substances témoins

19. Pour chaque produit chimique testé et substance témoin positive, une expérience est nécessaire pour dériver une prédiction (positive ou négative), comportant au minimum deux répétitions indépendantes portant chacune sur trois réplicats (soit $n = 6$). En cas de résultats discordants entre les deux répétitions indépendantes, une troisième répétition portant sur trois réplicats (soit $n = 9$) devra être effectuée. Chaque répétition indépendante est effectuée un jour

différent au moyen d'une solution-mère fraîche de produit chimique testé et de cellules collectées de façon indépendante. Les cellules peuvent cependant provenir du même repiquage.

20. Après ensemencement selon le mode opératoire décrit au paragraphe 14, les cellules sont mises en culture pendant 24 heures dans les plaques de microtitrage 96 puits. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu de culture frais (150 µl de milieu de culture contenant du sérum mais exempt de généticine conformément au protocole DB-ALM (9)) additionné de 50 µl du produit chimique testé et des substances témoins dilués 25 fois. Au moins un puits par plaque doit être laissé vide (sans cellules ni traitement) afin de déterminer les valeurs de fond.

21. Les plaques traitées sont ensuite mises en incubation pendant environ 48 heures à 37 °C ± 1 °C sous 5 % de CO₂. Il convient d'éviter l'évaporation des produits chimiques testés volatils, ainsi que les contaminations croisées entre puits par les produits chimiques testés, en couvrant par exemple les plaques d'une feuille protectrice pendant l'incubation avec les produits chimiques testés.

Mesure de l'activité de la luciférase

22. Les facteurs suivants sont déterminants pour une lecture correcte de la luminescence :

- le choix d'un luminomètre sensible ;
- l'utilisation d'un format de plaques de hauteur suffisante pour éviter une contamination croisée par la lumière ;
- l'utilisation d'un substrat de luciférase émettant suffisamment de lumière pour assurer une sensibilité satisfaisante et une faible variabilité ;
- un niveau de fond convenable et stable.

Avant l'essai, un test de contrôle sera réalisé selon le mode opératoire décrit à l'annexe 3 du présent appendice afin de vérifier que ces exigences sont remplies.

23. Après 48 heures d'exposition au produit chimique testé et aux substances témoins, les cellules sont lavées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate, et le tampon de lyse approprié pour la lecture de la luminescence est ajouté à chaque puits pendant une durée suffisante (20 minutes à température ambiante, par exemple).

24. Les plaques contenant le lysat cellulaire sont ensuite placées pour lecture dans le luminomètre qui est programmé pour : i) ajouter dans chaque puits le substrat de luciférase (50 µl), ii) attendre une seconde, puis iii) intégrer l'activité de la luciférase pendant 2 secondes. Si des paramètres différents sont utilisés compte tenu, par exemple, du modèle de luminomètre utilisé, il convient de les justifier. De plus, un substrat rayonnant peut également être utilisé, sous réserve que l'essai de contrôle de la qualité décrit à l'annexe 3 du présent appendice ait donné des résultats satisfaisants".

Évaluation de la cytotoxicité

25. Pour l'essai de viabilité cellulaire KeratinoSens™, le milieu est remplacé, après les 48 heures d'exposition, par du milieu frais contenant 5 mg/ml de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de thiazolyl tétrazolium bleu ; no CAS 298-93-1) et les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37 ± 1 °C sous 5 % de CO₂. Le milieu MTT est ensuite retiré et les cellules sont lysées en les exposant à un agent de lyse adapté pendant une durée suffisante (par exemple une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10 % pendant

la nuit). Après agitation, l'absorption est mesurée à 600 nm au photomètre, conformément au protocole de la méthode d'essai (9).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

26. Les paramètres suivants sont calculés dans la méthode KeratinoSens™ :

- valeur maximale moyenne du facteur d'induction de l'activité de la luciférase (I_{max}) à toute concentration du produit chimique testé et du témoin positif ;
- valeur de CE1.5, représentant la concentration à laquelle une induction de l'activité de la luciférase est supérieure au seuil de 1.5 fois (soit une activité augmentée de 50 %) ;
- concentrations CI50 et CI30 correspondant respectivement à une réduction de 50 % et 30 % de la viabilité cellulaire.

L'équation 1 permet de calculer le facteur d'induction de l'activité de la luciférase, et la valeur résultante maximale (I_{max}) est la moyenne de chacune des répétitions.

Équation 1 : facteur d'induction = $((L_{\text{échantillon}} - L_{\text{blanc}}) / (L_{\text{solvant}} - L_{\text{blanc}}))$

où

$L_{\text{échantillon}}$ est la luminescence mesurée dans le puits contenant le produit chimique testé

L_{blanc} est la luminescence mesurée dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

L_{solvant} est la valeur moyenne de la luminescence mesurée dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant (négatif)

CE1.5 est calculée par interpolation linéaire d'après l'équation 2, et la valeur résultante de la CE1.5 est la moyenne géométrique de chacune des répétitions.

Équation 2 : $CE1.5 = (C_b - C_a) \times ((1.5 - I_a) / (I_b - I_a)) + C_a$

où

C_a est la concentration la plus faible, en μM , à laquelle le facteur d'induction est > 1.5

C_b est la concentration la plus forte, en μM , à laquelle le facteur d'induction est < 1.5

I_a est le facteur d'induction mesuré à la concentration la plus faible à laquelle le facteur d'induction est > 1.5 (moyenne de trois puits réplicats)

I_b est le facteur d'induction mesuré à la concentration la plus forte à laquelle le facteur d'induction est < 1.5 (moyenne de trois puits réplicats)

L'équation 3 permet de calculer la viabilité :

Équation 3 : Viabilité = $((V_{\text{échantillon}} - V_{\text{blanc}}) / (V_{\text{solvant}} - V_{\text{blanc}})) \times 100$

où

V_échantillon est l'absorbance mesurée lors de l'essai au MTT dans le puits contenant le produit chimique testé

V_blanc est l'absorbance mesurée lors de l'essai au MTT dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

V_solvant est la valeur moyenne de l'absorbance mesurée lors de l'essai au MTT dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant (négatif)

CI50 et CI30 sont calculées par interpolation linéaire d'après l'équation 4, et les valeurs résultantes de CI50 et CI30 sont les moyennes géométriques de chacune des répétitions.

Équation 4 :
$$[CI]_{x} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100-x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

où

x est la réduction en % à la concentration à calculer (50 et 30 pour CI50 et CI30)

C_a est la concentration la plus faible en μM à laquelle la réduction de viabilité est $> x\%$

C_b est la concentration la plus forte en μM à laquelle la réduction de viabilité est $< x\%$

V_a est la viabilité en % à la concentration la plus faible à laquelle la réduction de viabilité est $> x\%$

V_b est la viabilité en % à la concentration la plus forte à laquelle la réduction de viabilité est $< x\%$

27. Pour chaque concentration à laquelle on observe un facteur d'induction de l'activité de la luciférase égal ou supérieur (\geq) à 1.5, on calcule la signification statistique (avec un test t de Student bilatéral, par exemple) en comparant les valeurs de la luminescence des trois échantillons réplicats avec les valeurs correspondantes de la luminescence des puits contenant le témoin de solvant/véhicule, afin de déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase est statistiquement significative ($p < 0.05$). En outre, il convient de vérifier que la concentration la plus faible à laquelle on observe un facteur d'induction ≥ 1.5 n'a pas d'effets cytotoxiques notables et qu'elle est inférieure à la CI30, autrement qu'elle entraîne une réduction de la viabilité cellulaire inférieure ou égale à 30 %. Il faut par ailleurs qu'au moins deux concentrations consécutives assurent une viabilité $> 70\%$, faute de quoi la fourchette de concentrations devra être ajustée.

28. Il est recommandé de vérifier visuellement les données à l'aide de graphiques. En l'absence de courbe dose-réponse clairement observable, ou si la courbe dose-réponse obtenue est biphasique (c'est-à-dire qu'elle croise deux fois le seuil de 1.5), il convient de répéter l'expérience pour vérifier si ce résultat est spécifique du produit chimique testé ou s'il s'agit d'un artefact expérimental. Dans le cas où la réponse biphasique est reproductible au cours d'un essai indépendant, c'est la concentration la plus faible, c'est-à-dire celle à laquelle la courbe croise le seuil de 1.5 pour la première fois, qui doit être consignée dans le rapport.

29. Dans la méthode KeratinoSensTM, dans les rares cas où l'on observe un facteur d'induction de l'activité de la luciférase égal ou supérieur à 1.5 sans que les valeurs soient statistiquement significatives, puis un facteur d'induction statistiquement significatif à une concentration plus élevée, les résultats de cette répétition ne sont considérés comme valides et positifs que si le facteur d'induction statistiquement significatif égal ou supérieur à 1.5 a été obtenu à une concentration non cytotoxique.

30. Enfin, pour les produits chimiques testés selon la méthode KeratinoSens™ qui génèrent un facteur d'induction égal ou supérieur à 1.5 à la concentration d'essai la plus faible (soit 0.98 µM), CE1.5 est fixée à < 0.98 sur la base d'un examen visuel de la courbe dose-réponse.

Critères d'acceptation

31. Les critères d'acceptation suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de la méthode KeratinoSens™.

- Le facteur d'induction de l'activité de la luciférase obtenu avec le témoin positif (aldéhyde cinnamique) doit être significativement supérieur au seuil de 1.5 (d'après un test t, par exemple) pour au moins une des concentrations testées (de 4 à 64 µM).
- La valeur de CE1.5 du témoin positif doit se situer dans un intervalle de deux écarts-types autour de la moyenne historique du laboratoire (entre 7 µM et 30 µM, par exemple, d'après les données utilisées pour la validation), qui devra être actualisée régulièrement. De plus, l'induction moyenne des trois réplicats pour l'aldéhyde cinnamique à 64 µM doit se situer entre 2 et 8. Si ce dernier critère n'est pas rempli, la relation dose-réponse pour l'aldéhyde cinnamique devra être vérifiée avec soin, et les tests ne pourront être acceptés que s'il existe une relation dose-réponse claire, l'induction de l'activité de la luciférase augmentant avec la concentration pour le témoin positif.
- Le coefficient moyen de variation de la luminescence pour le témoin de solvant/véhicule (DMSO) doit être inférieur à 20 % pour chaque répétition. Si la variabilité est supérieure, les résultats ne doivent pas être pris en compte.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

32. Une prédiction KeratinoSens™ est considérée comme positive si les 4 conditions suivantes sont remplies lors de 2 répétitions sur 2 ou sur 3 ; dans le cas contraire, la prédiction KeratinoSens™ est considérée comme négative (figure 1) :

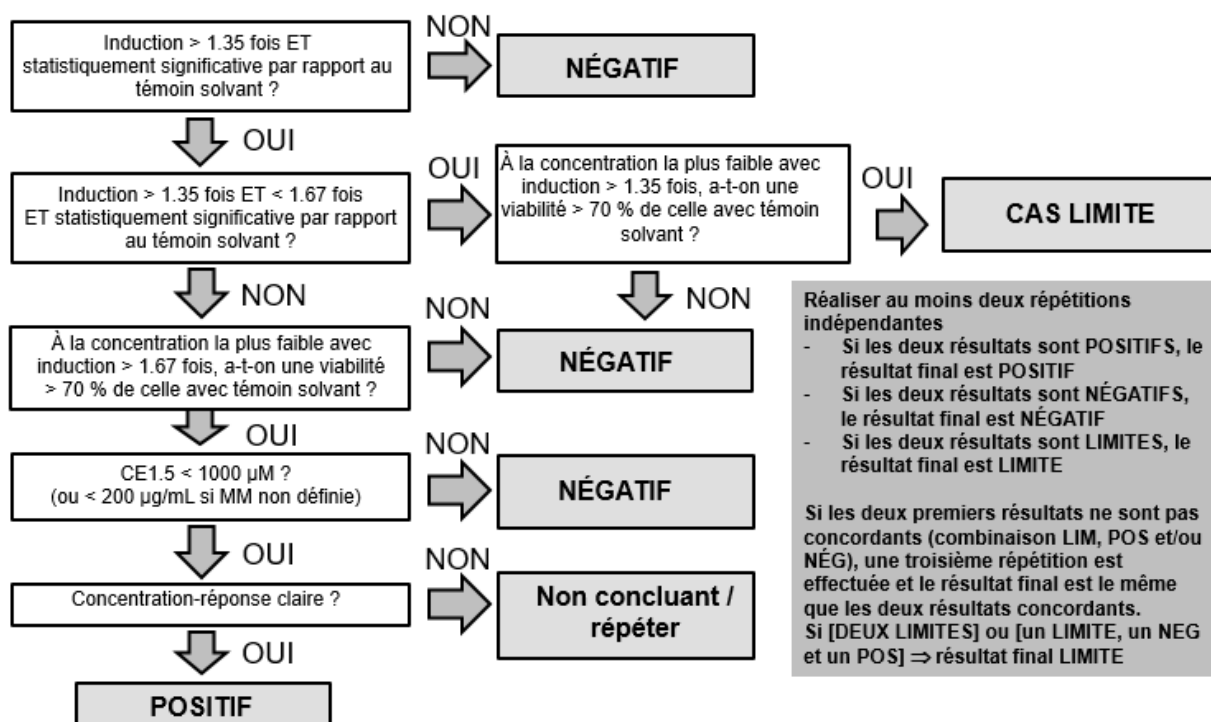
- I_{max} est égal ou supérieur à (\geq) 1.5 et les valeurs sont différentes de façon statistiquement significative de celles obtenues pour le témoin de solvant/véhicule (tel que déterminé par un test t de Student bilatéral non-apparié) ;
- la viabilité cellulaire est supérieure ($>$) à 70 % à la concentration la plus faible à laquelle le facteur d'induction de l'activité de la luciférase est égal ou supérieur à (\geq) 1.5 (c'est-à-dire à la concentration déterminant CE1.5) ;
- la valeur de CE1.5 est inférieure ($<$) à 1 000 µM (ou $<$ 200 µg/ml pour les produits chimiques testés dont la masse moléculaire n'est pas définie) ;
- on observe une augmentation de l'induction de la luciférase en fonction de la dose (ou une réponse bi-phasique, comme indiqué au paragraphe 28).

Si, lors d'une répétition donnée, les trois premières conditions sont remplies mais on n'observe pas clairement une augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase en fonction de la dose, le résultat de cette répétition doit être considéré comme non concluant et des tests supplémentaires peuvent être requis (figure 1). L'essai doit aussi être considéré comme non concluant si un résultat négatif a été obtenu avec le produit chimique testé à une concentration d'essai maximale $<$ 1 000 µM (ou $<$ 200 µg/ml pour les produits chimiques dont la masse moléculaire n'est pas définie) et qui n'entraîne pas de cytotoxicité (viabilité $<$ 70 %) (voir le paragraphe 4).

Figure1. Logigramme du modèle prédictif de KeratinoSens™ tenant compte de plages de valeurs limites (PVL) et des épreuves répétées pour conclure quant aux résultats limites

Une prédiction KeratinoSens™ doit être envisagée dans le cadre d'une approche définie ou d'une démarche IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale du présent document.

Interprétation des résultats pour une répétition complète



Le seuil initial de classification positive est une induction multipliée par 1.5, et la PVL autour de ce seuil (statistiquement déduite) est une induction multipliée par 1.35-1.67.

33. Dans les cas où les produits chimiques testés induisent une activité de la luciférase à des niveaux très proches des concentrations cytotoxiques, les résultats peuvent être positifs à des concentrations non cytotoxiques pour certaines répétitions (c.à.d. la concentration qui détermine CE1.5 est inférieure (<) à la CI30), et dans d'autres répétitions, positifs uniquement à des concentrations cytotoxiques (la concentration qui détermine CE1.5 est supérieure (>) à la CI30). Ces produits seront testés à nouveau en procédant à une analyse dose-réponse plus serrée, avec un facteur de dilution plus bas (par exemple, 1.33 ou $\sqrt{2}$ (= 1.41) fois entre puits), afin de déterminer si l'induction s'est produite à des niveaux cytotoxiques ou non (3).

Rapport d'essai

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

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, par exemple un numéro de lot ou une date d'expiration ;
 - apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
 - informations sur la solubilité/l'insolubilité ou sur la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans le milieu d'exposition ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
 - concentration(s) testée(s) ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- 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 ;
- masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
- informations sur la solubilité/l'insolubilité ou sur la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans le milieu d'exposition ;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) testée(s) ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Témoins

Témoin positif

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

- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) testée(s) ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptation, s'il y a lieu.

Témoin de solvant/véhicule (négatif)

- identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans l'appendice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique testé.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- description de la méthode d'essai utilisée ;
- lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple) ;
- nombre de repiquages et niveau de confluence des cellules utilisées pour l'essai ;
- méthode de comptage des cellules utilisée pour l'ensemencement avant l'essai, et mesures prises pour assurer une répartition quantitative homogène des cellules (voir paragraphe 14) ;
- luminomètre utilisé (modèle, par exemple), en particulier réglages de l'instrument, substrat de luciférase utilisé, et démonstration de l'adéquation des mesures de luminescence, d'après le test décrit à l'annexe 3 du présent appendice ;
- procédure appliquée pour démontrer la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (par exemple au moyen des substances d'épreuve de compétence) ou pour démontrer la reproductibilité des performances dans le temps dans l'application de la méthode d'essai.

Mode opératoire

- nombre de répétitions et de réplicats utilisés ;
- concentrations de produit chimique testé, procédure d'application et durée d'exposition (si différente de la valeur recommandée) ;
- description des critères d'évaluation et de décision utilisés ;
- description des critères d'acceptation de l'étude utilisés ;
- description de toutes modifications du mode opératoire.

Résultats

- tableau des valeurs obtenues pour I_{max}, CE1.5 et la viabilité (c.à.d. CI50 et CI30) avec le produit chimique testé et le témoin positif dans chaque répétition, ainsi que les valeurs moyennes (moyenne arithmétique pour I_{max} ; moyenne géométrique pour CE1.5 et la viabilité) et les écarts-types calculés en utilisant les données de toutes les répétitions, et indication du classement du produit chimique testé selon le modèle prédictif ;
- coefficient de variation des données de luminescence obtenues dans chaque expérience pour le témoin de solvant/véhicule (négatif) ;
- graphique représentant les courbes dose-réponse pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité ;
- description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- discussion des résultats obtenus avec la méthode d'essai KeratinoSens™ ;
- examen des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche IATA, si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusion

Bibliographie

- (1) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. 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)
- (2) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (3) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (4) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- (6) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (7) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
- (8) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (9) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Available: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (10) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
- (11) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1353-1364.
- (12) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/pre-prohaptent-workshop-report>.
- (13) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (14) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No.

457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (15) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (16) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.
- (17) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (18) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (19) Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.
- (20) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- (21) Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G (2015). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol Sci* 143, 319-332.
- (22) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol* 89, 2355-2383.
- (23) Strickland J, Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Allen D, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Casey W, Kleinstreuer N (2017). Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol* 37, 347-360.
- (24) Delaine T, Ponting DJ, Niklasson IB, Emter R, Hagvall L, Norrby PO, Natsch A, Luthman K, Karlberg AT (2014). Epoxyalcohols: bioactivation and conjugation required for skin sensitization. *Chem Res Toxicol* 27, 1860-1870.
- (25) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 387-396.
- (26) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1813-1822.
- (27) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- (28) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line:

Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. In Vitro* 27, 2225-2232.

- (29) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (30) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (31) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- (32) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- (33) Belot N, Sim B, Longmore CL, Roscoe L, Treasure C. (2017) Adaptation of the KeratinoSens™ skin sensitisation test to animal-product-free cell culture. *ALTEX*. 2017 Mar 16. doi: 10.14573/altex.1701311
- (34) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82, 147-155.

APPENDICE IA - ANNEXE 1

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée in vitro : méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase KeratinoSens™

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme au présent appendice de la LD 442D, les laboratoires doivent apporter la preuve de leur compétence technique en obtenant les prédictions attendues de la méthode KeratinoSens™ pour les 10 substances d'épreuve de compétence recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de CE1.5 et CI50 se situant dans les domaines de référence respectifs de ces deux grandeurs pour au moins 8 des 10 substances d'épreuve de compétence. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la qualité élevée des données de référence in vivo disponibles et des données in vitro obtenues par la méthode KeratinoSens™.

Tableau 1. Substances recommandées pour apporter la preuve de la compétence technique dans le cas de la méthode d'essai KeratinoSens™

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	Forme physique	Prédiction ELGL (1)	Catégorie chez l'homme (2)	Prédiction KeratinoSens™ (3)	CE _{1.5} (µM), domaine de référence (4)	CI ₅₀ (µM), domaine de référence (5)
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non-sensibilisant	Cat. 6	Négatif	> 1 000	> 1 000
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Cat. 6	Négatif	> 1 000	> 1 000
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-sensibilisant	Cat. 6	Négatif	> 1 000	> 1 000
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-sensibilisant	Cat. 5	Négatif	> 1 000	> 1 000
Diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	Cat. 4	Positif	5 - 125	> 500
Alcool cinnamylrique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	Cat. 3	Positif	25 - 175	> 1 000
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	Cat. 3	Positif	25 - 250	> 500
Sulfate de 4-méthylaminophénol	55-55-0	Solide	Sensibilisant (fort)	Cat. 3	Positif	< 12.5	20 - 200
Méthyl dibromoglutaronitrile	35691-65-7	Solide	Sensibilisant (fort)	Cat. 2	Positif	< 20	20 - 100
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Cat. 1	Positif	< 12.5	5 - 20

Note : (1) La prédiction des dangers (et de la puissance) in vivo est fondée sur les données ELGL (7). La puissance in vivo est déterminée au moyen des critères proposés par ECETOC (15).

(2) D'après Basketter et al. (32). Une substance est : en cat. 1 une cause manifeste d'allergie par contact, en cat. 2 une cause fréquente d'allergie par contact, en cat. 3 une cause courante d'allergie par contact, en cat. 4 une cause peu fréquente d'allergie par contact, en cat. 5 une cause rare d'allergie par contact. En cat. 6, il n'y a globalement pas d'éléments attestant que la substance entraîne une allergie par contact (32).

(3) Une prédiction KeratinoSens™ doit être envisagée dans le cadre d'une démarche définie ou de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale du présent document.

(4) D'après les données historiques observées (6).

APPENDICE IA - ANNEXE 2

ADAPTATION DE LA MÉTHODE D'ESSAI KERATINOSENS™ FAISANT APPEL À DES RÉACTIFS D'ORIGINE HUMAINE POUR OBTENIR UNE CULTURE CELLULAIRE EXEMPTÉ DE MATÉRIEL XÉNOGÉNIQUE

Cette section présente une adaptation de la méthode KeratinoSens™ qui peut être mise en œuvre à l'aide de réactifs d'origine humaine (sérum humain et trypsine recombinante humaine) afin d'obtenir une culture cellulaire exempte de matériel xénogénique, sous réserve d'apporter la preuve de la compétence technique (conformément à l'annexe 1) avec la méthode adaptée (33).

Tableau 2. Récapitulatif des adaptations

Description de la méthode	Méthode de référence validée (KeratinoSens™) (appendice 1A)	Adaptation exempte de matériel xénogénique (la présente annexe)
Sérum ¹	Mentionne « sérum » (le protocole 155 DB-ALM précise qu'il s'agit de sérum de veau fœtal) (paragraphe 13)	Sérum humain à 10 %
Mesure de la cytotoxicité ²	MTT : 4 heures d'incubation ; mettre en solution avec du SDS à 10 % pendant la nuit ; mesurer à 600 nm (paragraphe 25)	MTT (1 mg/ml) : 3 heures d'incubation ; dissoudre dans l'isopropanol ; mesurer à 570 nm
Témoin positif ²	Aldéhyde cinnamique 4-64 µM (paragraphe 18)	Aldéhyde cinnamique 8-128 µM
Trypsine ¹	Non spécifié (le protocole 155 DB-ALM indique « trypsine EDTA »)	Trypsine recombinante d'origine non animale (TrypZean, Sigma-Aldrich T3499)

Note : ¹adaptations visant des conditions exemptes de matériel xénogénique ; ²autres adaptations de la méthode (33).

Avant de l'utiliser pour les essais, on adaptera la lignée cellulaire KeratinoSens™ en réalisant les cultures de routine avec du sérum humain à 10 %. Le sérum humain (issu d'un groupe de donneurs) devra provenir d'une source commerciale fiable avec consentement adéquat des donneurs et mesures de contrôle de la qualité à des fins de culture cellulaire. Comme il convient pour tout type de sérum, on effectuera un essai de validation interne de chaque nouveau lot préalablement à son utilisation en examinant la morphologie des cellules, les taux de croissance et les valeurs I_{max} et CE_{1.5} au regard d'au moins un témoin positif et (de préférence) des produits chimiques de référence représentatifs (au moins un sensibilisant et un non-sensibilisant), et on en déduira éventuellement des limites quant à une utilisation satisfaisante à long terme. Si les cellules ont été cultivées antérieurement dans du sérum de veau fœtal, il faudra d'abord les repiquer au moins 3 fois avec du sérum humain. Si les cellules présentent une morphologie normale et des taux de croissance comparables à celles cultivées dans le sérum de veau fœtal, on peut constituer une banque cellulaire destinée aux essais à venir. Il est à noter qu'une lignée cellulaire KeratinoSens™ mise en culture dans du sérum humain ne doit pas être repiquée plus de 22 fois pour garantir une performance optimale, un maximum qui inclut le nombre de repiquages servant à adapter les cellules au sérum humain. Pour obtenir une culture cellulaire totalement exempte de matériel xénogénique, on aura recours à une trypsine recombinante d'origine non animale (Trypzean™, par exemple) pour récolter les cellules pendant la sous-culture (33). Tous les autres aspects du régime de culture de la lignée cellulaire KeratinoSens™ de référence restent conformes aux indications du présent appendice à la LD 442D et du protocole DB-ALM (9).

Pour ce qui concerne le paragraphe 18, l'adaptation exempte de matériel xénogénique de la méthode d'essai KeratinoSens™ faisant appel à des réactifs d'origine humaine a été optimisée en utilisant l'aldéhyde cinnamique (no CAS 14371-10-9, pureté > 98 %) comme témoin positif avec une gamme de concentrations finales allant de 8 à 128 µM. D'autres témoins positifs, donnant de préférence une CE1.5 située dans la fourchette des valeurs moyennes, peuvent être utilisés s'il existe des données historiques dont on peut tirer des critères d'acceptation issus de procédures comparables (33).

Concernant le paragraphe 25, l'adaptation exempte de matériel xénogénique de la méthode d'essai KeratinoSens™ faisant appel à des réactifs d'origine humaine a été optimisée en suivant la méthode d'évaluation de la cytotoxicité suivante : le milieu est remplacé, après les 48 heures d'exposition, par du milieu frais contenant du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; no CAS 298-93-1) à 1 mg/ml et les cellules sont incubées pendant 3 heures à 37 ± 1 °C sous 5 % de CO₂. Le milieu contenant du MTT est alors retiré et les cellules sont mises en solution dans de l'isopropanol. Après 30 minutes d'agitation, l'absorption est mesurée à 570 nm au spectrophotomètre.

Sur tous les autres aspects touchant la lignée cellulaire de référence, l'adaptation exempte de matériel xénogénique de la méthode d'essai KeratinoSens™ faisant appel à des réactifs d'origine humaine sera mise en œuvre conformément aux indications du présent appendice à la LD 442D et du protocole DB-ALM (9).

APPENDICE IA - ANNEXE 3

CONTRÔLE QUALITÉ DES MESURES DE LUMINESCENCE

Expérience préliminaire visant à garantir des mesures de luminescence optimales lors des essais suivant la méthode KeratinoSens™

Les trois paramètres suivants sont essentiels pour garantir l'obtention de résultats fiables au luminomètre:

- sensibilité suffisante assurant un niveau de fond stable dans les puits témoins ;
- absence de gradient sur la plaque dû à des temps de lecture trop longs ;
- absence de contamination lumineuse des puits à forte activité vers les puits adjacents.

Avant de procéder à l'essai, il est recommandé de vérifier la qualité des mesures de luminescence en testant une plaque témoin organisée comme indiqué ci-après (analyse en triplicat).

Organisation de la plaque pour l'essai préliminaire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	DMAE G 0.98	DMAE G 1.95	DMAE G 3.9	DMAE G 7.8	DMAE G 15.6	DMAE G 31.25	DMAE G 62.5	DMAE G 125	DMAE G 250	DMAE G 500	DMAE G 1 000	DMAE G 2 000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	AC 4	AC 8	AC 16	AC 32	AC 64	Vide

DMAEG = diméthacrylate d'éthylène glycol (no CAS 97-90-5), composé provoquant une forte induction

AC = aldéhyde cinnamique, témoin positif (no CAS 104-55-2)

Les concentrations sont indiquées en µM.

L'analyse de contrôle qualité doit établir :

- une augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase en fonction de la dose à la ligne D, avec $I_{max} > 20$ fois le niveau de fond (dans la plupart des cas, I_{max} atteint des valeurs comprises entre 100 et 300) ;
- une augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase en fonction de la dose dans les puits H7 à H11, avec un facteur d'induction de 2 à 8 dans les puits H11 ;
- l'absence d'augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase en fonction de la dose aux lignes C et E (pas de facteur d'induction égal ou supérieur à 1.5 (idéalement 1.3) en raison d'une possible contamination lumineuse, particulièrement à proximité des puits fortement actifs de la ligne DMAEG) ;
- l'absence de différence statistiquement significative entre les lignes A, B, C, E, F et G (absence de gradient sur la plaque) ;

- une variabilité dans les lignes A, B, C, E, F et G et les puits DMSO de la ligne H qui est inférieure à 20 % (niveau de fond stable).

Appendice IB. Sensibilisation cutanée in vitro : Méthode d'essai ARE-Nrf2 Luciférase LuSens

REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

1. La méthode d'essai décrite dans le présent appendice à la Ligne directrice pour les essais 442D porte sur le deuxième événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée (1), à savoir l'activation des kératinocytes. Cette méthode fait appel à la luciférase pour évaluer l'activation des gènes dépendant de l'élément de réponse antioxydant (ARE) médiée par le facteur Nrf2. Plusieurs études ont montré que les sensibilisants cutanés provoquent l'induction de gènes régulés par l'ARE (2) (3). Des substances électrophiles de petite taille telles que les sensibilisants cutanés peuvent agir sur la protéine détectrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), par exemple par une modification covalente de son résidu cystéine l'amenant à se dissocier du facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Le facteur Nrf2 dissocié peut alors activer les gènes dépendant de l'ARE, tels que ceux qui codent les enzymes détoxifiantes de phase II (2) (4) (5).
2. La méthode d'essai in vitro ARE-Nrf2 luciférase LuSens (ci-après désignée « méthode LuSens ») a fait l'objet d'une étude de validation axée sur les normes de performance fondée sur la méthode de référence validée (MRV) KeratinoSens™ (6) (7) (8) (9), suivie d'un examen indépendant par des pairs conduit par le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (10). La méthode LuSens a été considérée comme scientifiquement valide, dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins d'identification des dangers (10).
3. Il a été démontré que la méthode LuSens est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et satisfait les normes de performance en matière de reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (10). Par ailleurs, il ressort d'une étude interne antérieure menée sur 72 produits chimiques que la méthode LuSens offre des capacités de prédiction proches de celles de la MRV (précision de 74 %, sensibilité de 74 % et spécificité de 74 %) s'agissant de distinguer les sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) des non-sensibilisants sur la base des résultats ELGL (7) (10). Cette information atteste de l'utilité de la méthode LuSens comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode LuSens utilisée seule n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le cadre d'une approche définie ou d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale de la présente LD. En outre, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.
4. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode LuSens est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études in vivo) et propriétés physico-chimiques (7) (8). Elle est aussi applicable aux produits chimiques solubles ou formant

une dispersion stable dans le milieu d'exposition (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique testé ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant en formant plusieurs phases). Les produits chimiques testés qui ne remplissent pas ces conditions à la concentration finale maximale requise (soit 2 000 μM ou 2 000 $\mu\text{g/ml}$ si la masse moléculaire n'est pas disponible) peuvent néanmoins être testés à des concentrations plus faibles. Dans ce cas, les résultats qui répondent aux critères de positivité peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané. Un résultat négatif obtenu à une concentration maximale testée inférieure à 2 000 μM (ou 2 000 $\mu\text{g/ml}$ si la masse moléculaire n'est pas disponible) sans démonstration de cytotoxicité sera considéré comme non concluant (voir le modèle prédictif au paragraphe 32). Si le seuil de cytotoxicité (viabilité < 70 %) est atteint pour une concentration d'essai < 2 000 μM (ou < 2 000 $\mu\text{g/ml}$ si la masse moléculaire n'est pas disponible), les critères de négativité demeurent applicables. D'une manière générale, les substances mono-constituant dont le LogP est supérieur à 7 peuvent être insolubles dans le milieu d'exposition. Cela étant, s'il est possible d'obtenir et de documenter des solutions ou des dispersions stables, les substances en question peuvent être testées.

5. Les résultats négatifs sont à interpréter avec prudence, car les substances réactives exclusivement vis-à-vis des résidus lysine peuvent être identifiées comme négatives par la méthode d'essai : en effet, le mécanisme clé d'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE semble reposer sur la réaction électrophile de facteurs de stress avec les thiols nucléophiles (groupements sulfhydryles de la cystéine) de la protéine Keap-1. L'obtention de données complémentaires livrées par les essais sur la réactivité peptidique peut contribuer à lever cette incertitude, en particulier les essais permettant de distinguer la réactivité de la cystéine et celle de la lysine. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (12), ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (produits chimiques nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (produits chimiques activés par auto-oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs. Toutefois, il a été montré que la majorité des pré-haptènes (produits chimiques activés par auto-oxydation) et des pro-haptènes (produits chimiques nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) sont suffisamment bien identifiés par une combinaison de méthodes d'essai visant les événements clés 1, 2 et 3 de l'AOP, si bien que les résultats négatifs peuvent généralement servir à étayer la classification (13) (14) (15). À l'inverse, les produits chimiques testés qui n'agissent pas comme des sensibilisants, mais sont néanmoins des facteurs de stress chimique, peuvent donner lieu à des faux positifs comme le montre la MRV (11). Enfin, les produits chimiques testés qui interfèrent avec la luciférase peuvent créer un risque de confusion avec l'activité de la luciférase, dans les essais au niveau cellulaire, en provoquant soit une inhibition apparente soit une luminescence accrue (16). Ainsi, il a été signalé que des concentrations de phyto-œstrogènes supérieures à 1 μM interféraient avec les signaux de luminescence, dans d'autres essais avec gènes rapporteurs faisant intervenir la luciférase, du fait d'une suractivation du gène rapporteur de la luciférase (17). Il convient donc d'examiner attentivement l'expression de la luciférase obtenue à des concentrations élevées de phyto-œstrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur de la luciférase comparable à celle résultant des phyto-œstrogènes (17). Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode LuSens ne peut s'appliquer à d'autres catégories spécifiques de substances, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester ces catégories.

6. Outre qu'elle aide à distinguer les sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) des non-sensibilisants, la méthode LuSens fournit des informations (la relation dose-réponse, par exemple) susceptibles de contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation, dans le cadre d'une

approche intégrée comme la démarche IATA, conformément aux indications de la MRV (13). Cependant, une étude complémentaire s'appuyant de préférence sur des données humaines sera nécessaire pour déterminer de quelle façon les résultats de la méthode LuSens peuvent contribuer à l'évaluation de la puissance, en particulier dans le cadre d'une démarche IATA (18). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase combinées à d'autres sources d'information (15) (18).

7. Les termes sont définis dans l'annexe 1 de l'Introduction générale.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8 La méthode LuSens fait appel à une lignée de cellules adhérentes immortalisées dérivées de kératinocytes d'origine humaine qui contiennent de façon stable un gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse antioxydant (ARE) du gène NQO1 du rat (20). On sait que les gènes qui dépendent de l'ARE, comme le gène NQO1, intensifient leur expression sous l'effet de sensibilisants cutanés (21) (22). Cette lignée cellulaire contient le gène de la luciférase sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur fusionné à l'ARE (7). Le signal de la luciférase reflète l'activation par les sensibilisants de gènes endogènes dépendant du facteur Nrf2, et la dépendance du signal de la luciférase vis-à-vis de Nrf2 dans la lignée cellulaire recombinante a été démontrée directement pour la MRV (23), et indirectement pour la méthode LuSens (7). Cela permet la mesure quantitative (par détection de luminescence) de l'induction du gène de la luciférase, grâce à l'utilisation de substrats de luciférase produisant une luminescence satisfaisante, comme indicateur de l'activité du facteur de transcription Nrf2 dans les cellules après exposition à des produits chimiques testés électrophiles.

9. Dans la méthode LuSens, les produits chimiques testés sont considérés comme positifs s'ils provoquent une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase dépassant un seuil donné (c.à.d. ≥ 1.5 fois, soit 50 % d'augmentation) à au moins deux concentrations consécutives n'affectant pas significativement la viabilité cellulaire (soit viabilité $> 70\%$) (7) (8). On détermine à cet effet l'induction de l'activité de la luciférase par rapport au témoin de solvant/véhicule. D'autre part, des mesures de cytotoxicité devront être réalisées en parallèle pour déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase survient à des concentrations sub-cytotoxiques.

10. Avant d'utiliser en routine la méthode LuSens conformément à la présente LD, les laboratoires devront apporter la preuve de leur compétence technique, en appliquant la méthode aux dix substances listées à l'annexe 1 de cet appendice.

MODE OPÉRATOIRE

11. Un protocole DB-ALM est disponible pour la méthode LuSens et il convient de l'appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai en laboratoire (24). L'annexe 2 du présent appendice dresse un comparatif des principales étapes du protocole de la méthode LuSens par rapport à la MRV. Les laboratoires qui appliquent cette LD peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante utilisée dans la méthode d'essai en s'adressant aux développeurs de la méthode¹. L'essai fondé sur le gène rapporteur de la luciférase est protégé par une licence

¹ BASF SE, 67056 Ludwigshafen, Germany.

d'utilisation limitée Promega exigeant i) de faire appel aux réactifs pour essai de luminescence commercialisés par Promega, ou ii) de contacter Promega afin d'obtenir une licence libre pour une utilisation commerciale. On trouvera dans les paragraphes qui suivent une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode LuSens.

Préparation des cultures de kératinocytes

12. Il convient d'utiliser la lignée de cellules transgéniques LuSens comportant une insertion stable du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'ARE. À réception, les cellules sont multipliées conformément au protocole de la méthode d'essai (1 à 3 repiquages, par exemple) afin de former un stock homogène que l'on conservera à l'état congelé. Les cellules issues de ce stock d'origine peuvent être repiquées jusqu'à 20 fois au maximum, et servent aux essais de routine dans le milieu d'entretien/de croissance qui convient (par exemple le milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant du sérum et des antibiotiques comme la puromycine dans le milieu d'entretien (à des fins sélectives) et la combinaison pénicilline/streptomycine (pour éviter la contamination)), conformément au protocole de la méthode d'essai (24). Toutefois, aucun antibiotique n'est ajouté au milieu durant l'essai.

13. Pour les essais, les cellules doivent présenter une confluence de 80-90 %, et il convient de veiller à ce qu'elles n'arrivent jamais à confluence complète. Une journée avant l'essai, les cellules sont récoltées et réparties dans des plaques 96 puits selon la densité appropriée (soit 10 000 cellules/puits). On veillera à éviter la sédimentation des cellules durant l'ensemencement, afin d'assurer une distribution homogène du nombre de cellules entre les puits. Si ce n'est pas le cas, cette étape peut donner lieu à une forte variabilité entre puits. À chaque répétition de l'essai et pour chacune des concentrations du produit chimique testé, trois réplicats sont utilisés pour mesurer l'activité de la luciférase, et trois réplicats servent à évaluer la viabilité cellulaire.

Préparation du produit chimique testé et des substances témoins

14. Le produit chimique testé et les substances témoins sont préparés (ou décongelés, s'agissant de solutions stables congelées) le jour de l'essai. Les produits chimiques testés sont dissous dans un solvant adapté, par exemple du diméthylsulfoxyde (DMSO, no CAS 67-68-5, pureté ≥ 99 %), jusqu'à la concentration finale correspondant à la valeur maximale de l'essai (par exemple 200 mM). Les solutions de DMSO peuvent être considérées comme auto-stérilisantes, si bien qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une filtration stérile. Les produits chimiques testés qui ne sont pas solubles dans le DMSO sont dissous dans de l'eau stérile ou le milieu de culture, auquel cas il faut prendre les mesures nécessaires pour s'assurer que les solutions finales sont stériles. Lorsque la masse moléculaire du produit chimique testé n'est pas définie, une solution-mère est préparée à une concentration par défaut de 200 mg/ml ou 20 % (m/v). Si des solvants autres que le DMSO, l'eau ou le milieu de culture sont utilisés, il convient de fournir une justification scientifique adéquate.

15. À partir des solutions-mères du produit chimique testé, des dilutions en série sont préparées avec du DMSO ou, si le produit chimique n'est pas soluble dans le DMSO, avec de l'eau stérile ou du milieu de culture, de façon à obtenir des concentrations de référence du produit chimique à tester (12 concentrations allant de 0.098 à 200 mM, par exemple). Indépendamment du solvant utilisé, les concentrations de référence sont ensuite diluées 25 fois dans le milieu de culture contenant du sérum, et finalement utilisées pour le traitement après une nouvelle dilution de facteur 4, afin d'obtenir les concentrations finales du produit chimique testé (par exemple de

0.98 à 2 000 μM , sur la base d'un facteur de dilution égal à 2). Lorsque la masse moléculaire du produit chimique testé n'est pas définie, une série de dilutions est réalisée à l'aide de DMSO ou d'un autre solvant adapté jusqu'à obtenir les concentrations finales attendues (de 0.98 à 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, par exemple).

16. Un essai préliminaire de détermination des doses cytotoxiques est d'abord réalisé, par exemple à partir des concentrations indiquées ci-dessus, en vue d'établir la concentration à laquelle la viabilité cellulaire est égale à 75 % (CV75). La CV75 sert ensuite à déterminer les concentrations à analyser dans l'essai principal d'induction de la luciférase et le test de cytotoxicité effectué en parallèle (par exemple, une concentration supérieure à la CV75, la CV75, et quatre concentrations inférieures à la CV75 sur la base d'un facteur de dilution de 1.2, ce qui donne la série de concentrations suivante : CV75/2.07, CV75/1.73, CV75/1.44, CV75/1.2, CV75 et CV75 x 1.2 μM). Il est possible d'utiliser d'autres concentrations si cela est justifié (dans le cas d'un produit peu soluble ou dont la cytotoxicité est trop faible ou trop forte, par exemple) (24).

17. Un témoin de solvant/véhicule concomitant (DMSO, par exemple) sera testé dans chaque répétition, et le nombre suffisant de puits sera préparé à cet effet sur chaque plaque (par exemple 12 pour l'essai préliminaire de détermination de la dose cytotoxique, et 24 pour l'essai principal d'induction de la luciférase, selon les indications du protocole (24)). Le témoin de solvant/véhicule est soumis aux mêmes dilutions que celles décrites au paragraphe 15 pour les concentrations de référence, de telle sorte que la concentration finale du témoin de solvant/véhicule est la même que dans les produits chimiques testés et dans le témoin positif (soit 1 %) et n'affecte pas significativement la viabilité cellulaire. Si le produit chimique testé n'est pas soluble dans le solvant employé (comme le DMSO) et a été dilué dans l'eau, la concentration de solvant dans tous les puits de la solution d'essai finale pour ce produit doit être ajustée de manière à correspondre à la concentration de solvant utilisée pour les autres produits chimiques testés et substances témoins (soit 1 %).

18. Un témoin négatif concomitant sera également testé dans chaque répétition, et le nombre suffisant de puits sera préparé à cet effet sur chaque plaque (par exemple 3 pour l'essai préliminaire de détermination de la dose cytotoxique, et 6 pour l'essai principal de l'activité de la luciférase, d'après le protocole (24)). Dans la méthode LuSens, le témoin négatif concomitant testé est l'acide lactique DL (no CAS 50-21-5, pureté ≥ 99 %) à 5 000 μM (ou 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$), connu pour être un non-sensibilisant et donner lieu à une prédiction négative. D'autres témoins négatifs adaptés peuvent être utilisés s'il existe des données historiques dont on peut tirer des critères d'acceptation issus de procédures comparables. En outre, la méthode LuSens exige de prévoir un nombre suffisant de puits (par exemple 6 pour l'essai préliminaire de détermination de la dose cytotoxique, et 12 pour l'essai principal d'induction de la luciférase, d'après le protocole (24)) pour le témoin du milieu à blanc, c'est-à-dire des puits contenant uniquement des cellules non traitées et du milieu de culture.

19. Un témoin positif concomitant sera également testé dans chaque répétition, et le nombre suffisant de puits sera préparé à cet effet afin de démontrer que le système d'essai aboutit à la réponse attendue (par exemple 2 pour l'essai préliminaire de détermination de la dose cytotoxique, et 5 pour l'essai principal d'induction de la luciférase, d'après le protocole (24)). La méthode LuSens fait appel au diméthacrylate d'éthylène glycol (DMAEG, no CAS 97-90-5, pureté ≥ 99 %) à 120 μM . Le témoin positif est préparé en suivant les mêmes étapes de dilution que celles qui sont indiquées au paragraphe 14 pour les concentrations de référence ainsi que dans les protocoles de la méthode d'essai (24). Si à 120 μM le témoin positif est trop toxique ou ne permet pas d'obtenir un facteur d'induction de la luciférase ≥ 2.5 (voir paragraphe 31) du fait, par exemple,

de nouvelles installations en laboratoire ou de l'emploi d'un nouveau lot de DMAEG, le laboratoire concerné pourra réaliser un essai de détermination de l'ordre de grandeur avec le DMAEG (reproduit au moins deux fois supplémentaires pour confirmation) afin d'établir à quelle concentration l'induction de la luciférase est ≥ 2.5 fois celle obtenue avec le témoin de solvant/véhicule et la viabilité cellulaire est ≥ 70 %. Enfin, d'autres témoins positifs adaptés, donnant de préférence une CE1.5 située dans la fourchette des valeurs moyennes, peuvent être utilisés s'il existe des données historiques dont on peut tirer des critères d'acceptation issus de procédures comparables.

Application des produits chimiques testés et des substances témoins

20. Pour chaque produit chimique testé, une expérience est nécessaire pour dériver une prédiction (positive ou négative), comportant au minimum deux répétitions indépendantes portant chacune sur trois réplicats (soit $n = 6$). En cas de résultats discordants entre les deux répétitions indépendantes, une troisième répétition portant sur trois réplicats (soit $n = 9$) devra être effectuée. Chaque répétition indépendante est effectuée un jour différent au moyen d'une solution-mère fraîche de produit chimique testé et de cellules collectées de façon indépendante. Les cellules peuvent cependant être issues du même repiquage.

21. Après ensemencement selon le mode opératoire décrit au paragraphe 13, les cellules sont mises en culture pendant 24 heures dans les plaques de microtitrage 96 puits. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu de culture frais (150 μ l de DMEM contenant du sérum mais exempt d'antibiotiques, conformément au protocole de la méthode (24)) additionné de 50 μ l du produit chimique testé et des substances témoins dilués 25 fois. Au moins un puits par plaque doit être laissé vide (sans cellules ni traitement) afin de déterminer les valeurs de fond.

22. Les plaques traitées sont ensuite mises en incubation pendant environ 48 heures à $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ sous 5 % de CO_2 . Il convient d'éviter l'évaporation des produits chimiques testés volatils, ainsi que les contaminations croisées entre puits par les produits chimiques testés, en couvrant par exemple les plaques d'une feuille protectrice pendant l'incubation avec les produits chimiques testés.

Mesure de l'activité de la luciférase

23. Les facteurs suivants sont déterminants pour une lecture correcte de la luminescence :

- le choix d'un luminomètre sensible ;
- l'utilisation d'un format de plaques de hauteur suffisante pour éviter une contamination croisée par la lumière ;
- l'utilisation d'un substrat de luciférase émettant suffisamment de lumière pour assurer une sensibilité satisfaisante et une faible variabilité ;
- un niveau de fond convenable et stable.

Avant l'essai, un test de contrôle sera réalisé selon le mode opératoire décrit à l'annexe 3 du présent appendice afin de vérifier que ces exigences sont remplies.

24. Après 48 heures d'exposition au produit chimique testé et aux substances témoins, les cellules sont lavées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate, et le tampon de lyse approprié pour la lecture de la luminescence est ajouté à chaque puits pendant une durée suffisante (5-10 minutes dans l'obscurité, par exemple).

25. Les plaques contenant le lysat cellulaire sont ensuite placées pour lecture dans le luminomètre programmé selon les dispositions du protocole établi pour cette méthode (24). Si des paramètres différents sont utilisés compte tenu, par exemple, du modèle de luminomètre utilisé, il convient de les justifier. De plus, un substrat rayonnant peut également être utilisé, sous réserve que l'essai de contrôle de la qualité décrit à l'annexe 3 du présent appendice ait donné des résultats satisfaisants.

Évaluation de la cytotoxicité

26. Pour le test de viabilité cellulaire LuSens, le milieu est remplacé, après les 48 heures d'exposition, par du milieu frais contenant 0,5 mg/ml de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de thiazolyl tétrazolium bleu ; no CAS 298-93-1) et les cellules sont incubées pendant 2 heures à 37 ± 1 °C sous 5 % de CO₂. Le milieu MTT est ensuite retiré et les cellules sont lysées par exposition à un agent de lyse approprié pendant une durée suffisante (par exemple une solution de SDS à 10 % (m/v) et d'acide acétique à 0.4 % (v/v) dans du DMSO pendant 5 min). Après agitation, l'absorption est mesurée selon les paramètres prescrits par le protocole de la méthode d'essai (24).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

27. Les paramètres suivants sont calculés dans la méthode LuSens (voir l'annexe 4 du présent appendice pour les équations détaillées) :

- Facteur d'induction de l'activité de la luciférase à toutes les concentrations du produit chimique testé, du témoin positif et du témoin négatif.
- Viabilité cellulaire (VC) à toutes les concentrations du produit chimique testé et pour tous les témoins afin de déterminer (par interpolation) la valeur de la concentration à laquelle on obtient une viabilité de 75 % (CV75).

28. Pour chaque concentration à laquelle on observe un facteur d'induction de l'activité de la luciférase égal ou supérieur (\geq) à 1.5, on calcule la signification statistique (par un test t de Student bilatéral, par exemple) en comparant les valeurs de la luminescence mesurées pour les trois échantillons réplicats avec les valeurs correspondantes de la luminescence des puits contenant le témoin de solvant/véhicule, afin de déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase est statistiquement significative ($p < 0.05$). On vérifie en outre qu'il n'y a pas d'effet cytotoxique notable à ces concentrations (autrement dit, que la viabilité cellulaire est ≥ 70 % aux concentrations qui entraînent un facteur d'induction de la luciférase ≥ 1.5).

29. Il est recommandé de vérifier visuellement les données à l'aide de graphiques. En l'absence de courbe dose-réponse clairement observable, ou si la courbe dose-réponse obtenue est biphasique (c'est-à-dire qu'elle croise deux fois le seuil de 1.5), il convient de répéter l'expérience pour vérifier si ce résultat est spécifique du produit chimique testé ou s'il s'agit d'un artefact expérimental. Dans le cas où la réponse biphasique est reproductible au cours d'un essai indépendant, c'est la concentration la plus faible, c'est-à-dire à laquelle la courbe croise le seuil de 1.5 pour la première fois, qui doit être consignée dans le rapport. En revanche, il n'est pas exigé de fournir une concentration correspondant à la CE1.5.

30. Enfin, si la méthode LuSens donne lieu à un facteur d'induction de l'activité de la luciférase ≥ 1.5 uniquement à la concentration d'essai la plus faible (par exemple CV75/2.07), l'essai sera réalisé à nouveau en intégrant au moins une concentration inférieure à la CV75 supplémentaire.

Critères d'acceptation

31. Les critères d'acceptation suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de la méthode LuSens. Si l'un des critères énoncés ci-dessous n'est pas satisfait, les données ne sont pas prises en compte et une nouvelle répétition est réalisée.

- La valeur moyenne du facteur d'induction de l'activité de la luciférase obtenue avec le témoin positif, à savoir le DMAEG à 120 μM (ou une concentration comparable, voir à cet égard le paragraphe 19), est ≥ 2.5 , et le témoin positif donne lieu à une viabilité cellulaire $\geq 70\%$ de la viabilité mesurée pour le témoin de solvant/véhicule.
- Les valeurs moyennes de l'induction de l'activité de la luciférase obtenues avec le témoin négatif, à savoir l'acide lactique DL à 5 000 μM , et avec les cellules non traitées sont < 1.5 fois les valeurs moyennes obtenues pour le témoin de solvant/véhicule.
- Le coefficient moyen de variation de la luminescence pour les témoins de solvant/véhicule (DMSO, par exemple) est inférieur à 20 % pour chaque répétition.
- Au moins trois concentrations d'essai entraînent une viabilité cellulaire égale à au moins 70 % de celle obtenue avec les témoins de solvant/véhicule. De plus, pour qu'un résultat soit considéré comme négatif, il faut qu'une concentration au moins soit cytotoxique, c'est-à-dire qu'elle donne une viabilité cellulaire $< 70\%$, ou que la concentration maximale de 2 000 μM (2 000 $\mu\text{g/ml}$ pour les substances dont la masse moléculaire n'est pas définie) ait été testée.

Il arrive que les produits chimiques testés n'entraînent aucune cytotoxicité, auquel cas la concentration d'essai maximale sera 2 000 μM (2 000 $\mu\text{g/ml}$ pour les substances dont la masse moléculaire n'est pas définie). Si aucune des concentrations testées dans l'essai principal d'induction de la luciférase n'est cytotoxique, c'est-à-dire qu'aucune d'elles n'entraîne de viabilité cellulaire $< 70\%$, et si aucune hausse d'activité de la luciférase n'est observée, une deuxième répétition sera effectuée avec, par exemple, une série de dilutions de la CV75 selon un facteur 1.44 (à commencer par 1.44 x CV75) au lieu du facteur 1.2 adopté dans l'essai principal. Si cette deuxième répétition n'entraîne toujours pas de cytotoxicité ni d'induction de la luciférase, une troisième répétition sera mise en œuvre avec une concentration maximale de 2 000 μM (2 000 $\mu\text{g/ml}$ pour les substances dont la masse moléculaire n'est pas définie). Cette troisième répétition sera ensuite confirmée par une quatrième répétition.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

32. Une prédiction LuSens est considérée comme positive si les conditions suivantes sont remplies lors de 2 répétitions sur 2 ou sur 3 ; dans le cas contraire, la prédiction LuSens est considérée comme négative (figure 1) :

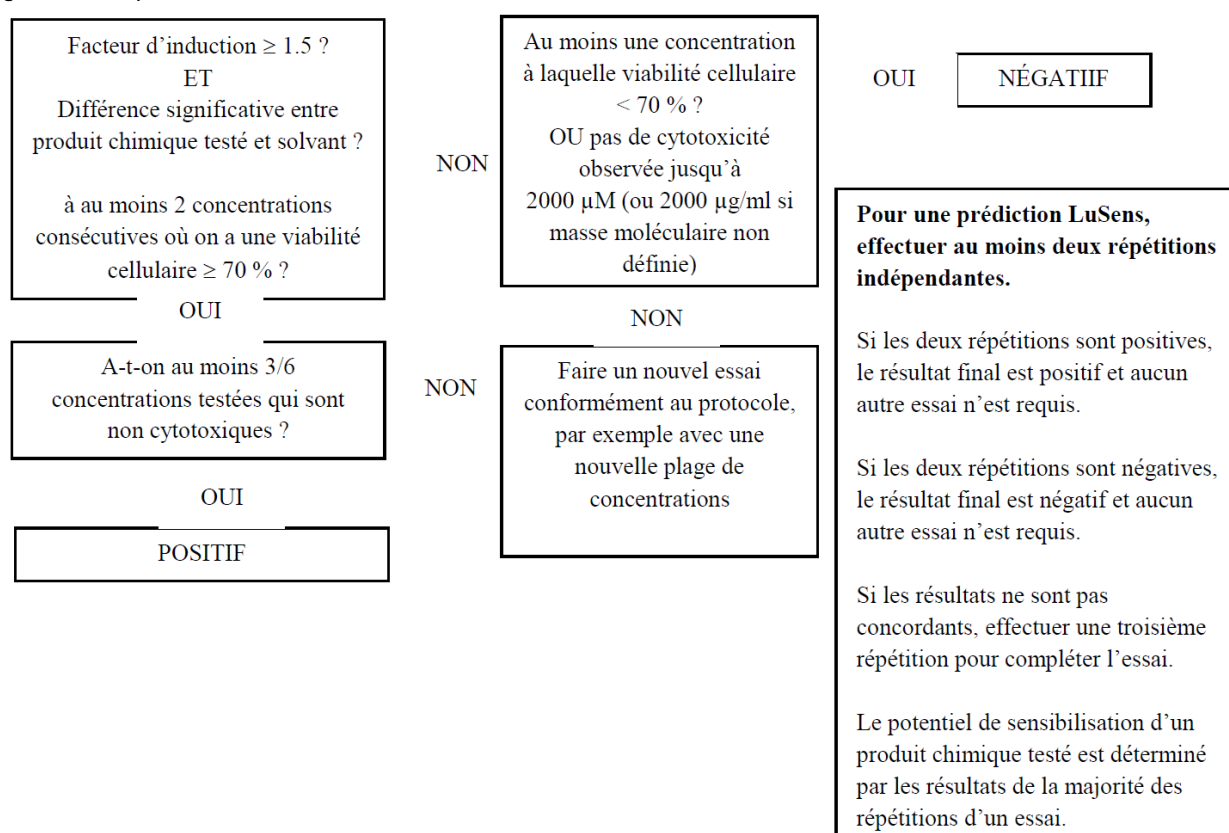
Le facteur d'induction de la luciférase est supérieur ou égal (\geq) à 1.5 et les valeurs sont différentes de façon statistiquement significative de celles obtenues pour le témoin de solvant à au moins deux concentrations d'essai non cytotoxiques consécutives (c.à.d.

viabilité cellulaire égale ou supérieure (\geq) à 70 %), et au moins trois concentrations d'essai sont non cytotoxiques (viabilité cellulaire égale ou supérieure (\geq) à 70 %).

En outre, quand un résultat négatif a été obtenu pour un produit chimique qui ne forme pas de dispersion stable et qui a été testé à une concentration d'essai maximale $< 2\ 000\ \mu\text{M}$ (ou $< 200\ \mu\text{g/ml}$ pour les produits chimiques dont la masse moléculaire n'est pas définie) et sans démonstration de cytotoxicité pour les concentrations testées (voir paragraphe 31), l'essai sera également considéré comme non concluant (voir le paragraphe 4).

Figure2. Récapitulatif des critères de prédiction dans la méthode d'essai LuSens.

Une prédiction LuSens doit être envisagée dans le cadre d'une approche définie ou d'une démarche IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 4, 7 et 8 de l'Introduction générale du présent document



Procédure pour une répétition

1.1.1. Rapport d'essai

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

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, par exemple un numéro de lot ou une date d'expiration ;
- apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- informations sur la solubilité/l'insolubilité ou sur la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans le milieu d'exposition ;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) testée(s) ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- 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 ;
- informations sur la solubilité/l'insolubilité ou sur la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans le milieu d'exposition ;
- masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) testée(s) ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins

- Témoin positif
 - identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
 - apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
 - concentration(s) testée(s) ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;

- référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptation, s'il y a lieu.
- Témoin de solvant/véhicule
 - identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans cet appendice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique testé.
- Témoin négatif
 - identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans cet appendice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - justification du choix du témoin négatif, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans la LD sont utilisés.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- description de la méthode d'essai utilisée ;
- lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple) ;
- nombre de repiquages et niveau de confluence des cellules utilisées pour l'essai ;
- méthode de comptage des cellules utilisée pour l'ensemencement avant l'essai, et mesures prises pour assurer une répartition quantitative homogène des cellules (voir paragraphe 13) ;
- luminomètre utilisé (modèle, par exemple), en particulier réglages de l'instrument, substrat de luciférase utilisé, et démonstration de l'adéquation des mesures de luminescence, d'après le test décrit à l'annexe 3 du présent appendice
- procédure appliquée pour démontrer la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (par exemple au moyen des substances d'épreuve de compétence) ou pour démontrer la reproductibilité des performances dans le temps dans l'application de la méthode d'essai.

Mode opératoire

- nombre de répétitions et de réplicats utilisés ;
- concentrations de produit chimique testé, procédure d'application et durée d'exposition (si différente de la valeur recommandée) ;
- description des critères d'évaluation et de décision utilisés ;
- description des critères d'acceptation de l'étude utilisés ;
- description de toutes modifications du mode opératoire.

Résultats

- tableau des valeurs du facteur d'induction de l'activité de la luciférase et de la viabilité (c.à.d. CV75 dans le cas de la méthode d'essai LuSens) obtenues pour le produit chimique testé et pour le témoin positif à chaque répétition ;
- valeurs moyennes (moyennes arithmétiques de la viabilité cellulaire et du facteur d'induction de l'activité de la luciférase) et écarts-types calculés à partir des données de chaque répétition ;
- indication du classement du produit chimique testé selon le modèle prédictif ;
- coefficient de variation des données de luminescence obtenu dans chaque expérience pour le témoin de solvant/véhicule ;
- graphique représentant les courbes dose-réponse pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité ;
- description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- discussion des résultats obtenus avec la méthode LuSens ;
- examen des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche IATA, si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusion

Bibliographie

- (1) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. 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)
- (2) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (3) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (4) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- (6) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol. In Vitro* 28, 1482-1497.
- (8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* 32, 278-286.
- (9) EURL ECVAM (2018). The LuSens test method Validation Study Report. Accessible at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10>
- (10) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf.
- (11) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (12) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
- (13) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1353-1364.
- (14) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal

methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/pre-prohaptent-workshop-report>.

- (15) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.
- (16) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (17) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (18) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (19) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- (20) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 387-396.
- (21) Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, Ourlin JC. (2009); HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol Sci.* 2009 Feb;107(2):451-60.
- (22) Rob J. Vandebriel, Jeroen L. A. Pennings, Kirsten A. Baken, Tessa E. Pronk, Andre Boorsma, Ralph Gottschalk, Henk Van Loveren; Keratinocyte Gene Expression Profiles Discriminate Sensitizing and Irritating Compounds, *Toxicological Sciences*, Volume 117, Issue 1, 1 September 2010, Pages 81–89, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq182>
- (23) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. In Vitro* 27, 2225-2232.
- (24) DB-ALM Protocol No. 184 (2017). LuSens Assay. Available at <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>
- (25) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
- (26) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.

APPENDICE IB - ANNEXE 1

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée in vitro : méthode d'essai ARE-Nrf2 Luciférase LuSens

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme au présent appendice de la LD 442D, les laboratoires doivent apporter la preuve de leur compétence technique en obtenant les prédictions attendues de la méthode LuSens pour les 10 substances d'épreuve recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs brutes situées dans les domaines de référence pour au moins 8 de ces 10 substances. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la qualité élevée des données de référence in vivo disponibles et des données in vitro obtenues par la méthode LuSens.

Tableau 1 : Substances recommandées pour apporter la preuve de la compétence technique dans le cas de la méthode d'essai LuSens

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	Forme physique	Prédiction ELGL (1)	Catégorie chez l'homme (2)	LuSens		
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non-sensibilisant	Cat. 6	Négatif	> 1 000	> 2 000
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-sensibilisant	Cat. 6	Négatif	> 1 000	> 2 000
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-sensibilisant	Cat. 5	Négatif	> 1 000	> 2 000
Sulfanilamide	63-74-1	Solide	Non-sensibilisant	Négatif (Basketter <i>et al.</i> 1994)	Négatif	> 1 000	> 2 000
Eugénol	97-53-0	Liquide	Sensibilisant (faible)	Cat. 3	Positif	< 500	< 1 000
Alcool cinnamylique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	Cat. 3	Positif	< 170	> 420
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	Cat. 3	Positif	< 800	< 2 000
Sulfate de 4-méthylaminophénol	55-55-0	Solide	Sensibilisant (fort)	Cat. 3	Positif	< 30	< 50
Méthyl dibromoglutaronitrile	35691-65-7	Solide	Sensibilisant (fort)	Cat. 2	Positif	< 25	< 50
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Cat. 1	Positif	< 5	< 10

Note : (1) La prédiction des dangers (et de la puissance) *in vivo* est fondée sur les données ELGL (25). La puissance *in vivo* est déterminée au moyen des critères proposés par ECETOC (18).

- (2) D'après Basketter *et al.* (26). Une substance est : en cat. 1 une cause manifeste d'allergie par contact, en cat. 2 une cause fréquente d'allergie par contact, en cat. 3 une cause courante d'allergie par contact, en cat. 4 une cause peu fréquente d'allergie par contact, en cat. 5 une cause rare d'allergie par contact. En cat. 6, il n'y a globalement pas d'éléments attestant que la substance entraîne une allergie par contact.
- (3) La prédiction obtenue par la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase doit être envisagée dans le cadre d'une approche définie ou d'une démarche IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale du présent document.
- (4) D'après les données historiques observées (7) (8). Même si le modèle prédictif LuSens ne repose pas sur la $CE_{1.5}$, cette valeur peut être calculée à partir des données obtenues et utilisée pour déterminer les ordres de grandeur de réponse des substances d'épreuve de compétence pour cette méthode. Les valeurs de $CE_{1.5}$ sont calculées conformément aux indications fournies dans l'appendice IA (paragraphe 26).

APPENDICE IB - ANNEXE 2

Comparaison des principales étapes de la méthode LuSens et de la MRV KeratinoSens™

	MRV (KeratinoSens™)	LuSens
Préparation des cultures de kératinocytes		
Propagation	2 à 4 repiquages	1 à 3 repiquages
Stockage par cryoconservation	2 à 4 repiquages	3 repiquages
Repiquages des cellules avant l'essai principal	Au moins 2	Au moins 5
Nombre maximal de multiplication par repiquage à partir des stocks congelés	25 repiquages	20 repiquages pour les essais de détermination de la dose cytotoxique 15 repiquages pour l'essai principal d'induction de la luciférase
Milieu de propagation	DMEM + sérum et généticine	DMEM + sérum, pénicilline/streptomycine et puromicine
Confluence des cellules pour l'essai	80-90 %	
Délai de récolte des cellules avant l'essai	1 jour	
Taille de la plaque d'essai	Plaques 96 puits	
Nombre de cellulesensemencées pour l'essai	10 000 cellules/puits, sauf dans les puits servant à mesurer le niveau de fond	
Nombre de réplicats pour chaque concentration du produit chimique testé (dans chaque répétition)	3 puits (sur différentes plaques) pour mesurer la luciférase 1 puits pour l'évaluation de la cytotoxicité	3 puits (sur la même plaque) pour tous les essais c.à.d. l'essai de détermination de la dose cytotoxique et l'essai principal d'induction de la luciférase (y compris 3 puits pour mesurer la luciférase et 3 puits pour évaluer la cytotoxicité en parallèle)
Préparation du produit chimique testé et des substances témoins		
Préparation	Même jour que l'essai	
Solvant	DMSO, eau stérile ou autres milieux pour les produits chimiques testés insolubles dans le DMSO	DMSO ou autres milieux pour les produits chimiques testés insolubles dans le DMSO
Concentration de la solution-mère	200 mM	
Produits chimiques testés dont la masse moléculaire n'est pas définie	Solution-mère préparée à une concentration par défaut (40 mg/ml ou 4 % (m/v))	Solution-mère préparée à une concentration par défaut (200 mg/ml ou 20 % (m/v))
Série de concentrations finales testées dans la plaque 96 puits	12 concentrations (dilution de facteur 2) allant de 0.98 à 2 000 µM	<u>Essai de détermination de la dose cytotoxique :</u> 12 concentrations (dilution de facteur 2) allant de 0.98 à 2 000 µM <u>Essai principal d'induction de la luciférase :</u> 6 concentrations (dilution de facteur 1.2) allant de CV ₇₅ /2.074 à CV ₇₅ x 1.2 µM
Témoin de solvant	DMSO à 1 % (18 réplicats par répétition)	DMSO à 1 % (12 réplicats par répétition pour l'essai de

		détermination de 'la dose cytotoxique, et 24 réplicats par répétition pour l'essai principal d'induction de la luciférase)
Témoin négatif	Voir témoin de solvant	Acide lactique DL à 5 000 M (3 réplicats par répétition pour l'essai de détermination de 'la dose cytotoxique, et 6 réplicats par répétition pour l'essai principal d'induction de la luciférase)
Témoin positif	Aldéhyde cinnamique 4 concentrations (dilution de facteur 2) allant de 4 à 64 µM (3 réplicats par répétition)	DMAEG à 120 M ou autre concentration produisant un facteur d'induction de la luciférase = 2.5 ainsi qu'une viabilité cellulaire ≥ 70 % (2 réplicats par répétition pour l'essai de détermination de 'la dose cytotoxique, et 5 réplicats par répétition pour l'essai principal d'induction de la luciférase)
Témoin du milieu	Sans objet	(6 réplicats par répétition pour l'essai de détermination de 'la dose cytotoxique, et 12 réplicats par répétition pour l'essai principal d'induction de la luciférase)
Témoin à blanc (sans cellules)	3 réplicats par répétition	1 réplikat par répétition
Application des produits chimiques testés et des substances témoins, et effets mesurés		
Nombre de répétitions pour chaque concentration du produit chimique testé	Au moins deux répétitions indépendantes contenant chacune trois réplicats (n = 6), et en cas de résultats discordants, réalisation d'une troisième répétition (n = 9). Chaque répétition est mise en œuvre un jour différent avec des produits chimiques fraîchement préparés pour l'essai et des cellules récoltés indépendamment (elles peuvent toutefois avoir subi le même nombre de repiquages)	
Milieu de traitement des cellules	150 µl de milieu de culture DMEM contenant du sérum mais exempt d'antibiotiques (généticine, pénicilline/streptomycine et puromycine) additionné de 50 µl du produit chimique testé et des substances témoins dilués 25 fois.	
Régime d'exposition	48 heures à 37 ± 1 °C sous 5 % de CO ₂ Les plaques sont couvertes d'une feuille protectrice afin d'éviter l'évaporation des produits chimiques testés volatils ainsi que les contaminations croisées entre puits	
Mesure de la luminescence	Après l'exposition, les cellules sont lavées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate, et le tampon de lyse approprié pour la lecture de la luminescence est ajouté à chaque puits pendant 20 minutes à température ambiante. Les plaques contenant le lysat cellulaire sont ensuite placées pour lecture dans le luminomètre qui est programmé pour : i) ajouter dans chaque puits le substrat de luciférase, ii) attendre une seconde, puis iii) intégrer l'activité de la luciférase pendant 2 secondes.	Après l'exposition, le tampon de lyse approprié pour la lecture de la luminescence est ajouté à chaque puits, et l'ensemble est agité pendant 5-10 minutes dans l'obscurité. La luminescence est mesurée pendant 2 secondes au moyen d'un luminomètre. <i>D'autres conditions peuvent s'appliquer selon le type de luminomètre employé.</i>
Évaluation de la cytotoxicité	Après l'exposition, on ajoute 5 mg/ml de solution de MTT et les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37 °C ± 1 °C sous 5 % de CO ₂ Les cellules sont ensuite lysées pendant la nuit (avec une solution de SDS à	Après l'exposition, on ajoute 200 µl de solution de travail de MTT (0.5 mg/ml) et les cellules sont incubées pendant 2 heures à 37 °C ± 1 °C sous 5 % de CO ₂ Les cellules sont lysées pendant 5 min (avec une solution de SDS à 10 % (m/v) et d'acide

	10 %), agitées, puis l'absorption est mesurée à 600 nm	acétique à 0.4 % (v/v) dans du DMSO), puis l'absorption est mesurée à 570 et 690 nm
Effets mesurés	<p>I_{max} : moyenne des valeurs maximales du facteur d'induction de l'activité de la luciférase à toute concentration testée</p> <p>$CE_{1.5}$: concentration interpolée correspondant à un facteur d'induction de l'activité de la luciférase de 1.5</p> <p>CI_{50} / CI_{30} : concentrations interpolées correspondant respectivement à une viabilité cellulaire réduite de 50 % et 30 %</p>	<p>Le facteur d'induction de l'activité de la luciférase est la valeur moyenne établie pour chaque concentration testée</p> <p>La viabilité cellulaire est la valeur moyenne établie pour chaque concentration testée</p> <p>CV_{75} : concentration interpolée correspondant à une viabilité cellulaire de 75 %</p>
Critères d'acceptation		
Témoin positif de l'activité de la luciférase	<p>Facteur d'induction statistiquement significatif > 1.5 à au moins une des concentrations testées du témoin positif (aldéhyde cinnamique de 4 à 64 μM). La valeur $CE_{1.5}$ du témoin positif doit se situer à moins de 2 écarts-types de la moyenne historique (par exemple 2 à 30 μM dans l'ensemble des données de validation).</p> <p>La moyenne du facteur d'induction de l'aldéhyde cinnamique à 64 μM doit se situer entre 2 et 8.</p>	Le facteur d'induction, c'est-à-dire le rapport entre l'induction avec le témoin positif (par exemple DMAEG à 120 M) et l'induction avec le témoin de solvant, est = 2.5 à une concentration non cytotoxique, c'est-à-dire à laquelle la viabilité cellulaire est = 70 % de celle du témoin de solvant.
Témoin négatif de l'activité de la luciférase	Sans objet	Le facteur d'induction, c'est-à-dire le rapport entre l'induction avec le témoin négatif (acide lactique DL à 5 000 μ M) et l'induction avec le témoin de solvant, est < 1.5
Variabilité du témoin de solvant	Coefficient de variation = 20 % (18 réplicats)	Coefficient de variation = 20 % (Au moins 21 réplicats)
Autres	Sans objet	<p>Le niveau de fond du témoin du milieu (cellules en présence du milieu uniquement) doit provoquer une induction de l'activité de la luciférase < 1.5 fois celle obtenue avec le témoin de solvant</p> <p>Il faut qu'au moins trois concentrations d'essai (sur les 6 du principal essai d'induction de la luciférase) soient non cytotoxiques (viabilité cellulaire = 70 %). De plus, en cas de résultat négatif, au moins une des concentrations d'essai (sur les 6 du principal essai d'induction de la luciférase) doit être cytotoxique (viabilité cellulaire < 70 %).</p>
Modèle prédictif		
Une prédiction est considérée comme positive si les conditions ci-contre sont remplies lors de 2 répétitions sur 2 ou sur 3 ; dans le cas contraire, la prédiction est considérée comme négative.	<p>1. I_{max} est égal ou supérieur à (\geq) 1.5 fois et les valeurs sont différentes de façon statistiquement significative de celles obtenues pour le témoin de solvant (test t de Student bilatéral non-apparié) ;</p> <p>2. La viabilité cellulaire est supérieure à (>) 70 % à la concentration la plus faible à laquelle le facteur d'induction de l'activité de la luciférase est égal ou</p>	<p>1. Au moins deux concentrations non cytotoxiques (viabilité cellulaire égale ou supérieure (\geq) à 70 %) consécutives provoquent une induction de la luciférase égale ou supérieure (\geq) à 1.5 fois relativement au témoin de solvant.</p> <p>2. Au moins trois concentrations d'essai sont non cytotoxiques (viabilité cellulaire égale ou supérieure (\geq) à 70 %).</p>

	<p>supérieur à 1.5 (c'est-à-dire à la concentration déterminant CE_{1.5}) ;</p> <p>3. La valeur de CE_{1.5} est inférieure à (<) 1 000 µM (ou < 200 µg/ml pour les produits chimiques testés dont la masse moléculaire n'est pas définie) ;</p> <p>4. On observe une augmentation visible de l'induction de la luciférase en fonction de la dose</p>	
Produits chimiques ne formant pas une dispersion stable	Un résultat négatif obtenu avec des produits chimiques qui ne forment pas de dispersion stable à une concentration < 1 000 µM (ou < 200 µg/ml pour les produits chimiques testés dont la masse moléculaire n'est pas définie) sera jugé non concluant.	Un résultat négatif obtenu avec des produits chimiques qui ne forment pas de dispersion stable et qui n'ont pas été testés jusqu'à une concentration de 2000 µM (ou 2000 µg/ml pour les produits chimiques testés dont la masse moléculaire n'est pas définie) sera jugé non concluant.

APPENDICE IB - ANNEXE 3

CONTRÔLE QUALITÉ DES MESURES DE LUMINESCENCE

Expérience préliminaire visant à garantir des mesures de luminescence optimales lors des essais suivant la méthode LuSens

Afin de garantir des mesures de luminescence optimales, il est recommandé, lorsque l'essai est mis en œuvre pour la première fois, d'effectuer un ou deux tests en appliquant la méthode LuSens avec des concentrations croissantes de DMAEG (qui fera office de substance testée) en organisant la plaque comme indiqué ci-dessous. Ces répétitions sont réalisées en tenant compte des aspects suivants :

- l'induction de la luciférase doit augmenter en fonction de la dose (dans les puits A-C:1-6) après traitement avec des concentrations croissantes de DMAEG ;
- l'induction de la luciférase ne doit pas augmenter en fonction de la dose dans les puits D:1-6 et A-D: 7 (puits vides) par rapport à la luminescence observée dans les puits A-D: 8-12 ;
- l'écart-type moyen (en pourcentage) de la variabilité dans au moins 21 puits contenant le témoin de solvant/véhicule (F-G: 1-12) doit rester inférieur à 20 % et cette variabilité ne doit pas former un gradient.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMAEG CV ₇₅ /2. 07	DMAEG CV ₇₅ /1. 73	DMAEG CV ₇₅ /1. 44	DMAEG CV ₇₅ /1. 2	DMAEG CV ₇₅	DMAEG CV ₇₅ x 1 .2						
B	DMAEG CV ₇₅ /2. 07	DMAEG CV ₇₅ /1. 73	DMAEG CV ₇₅ /1. 44	DMAEG CV ₇₅ /1. 2	DMAEG CV ₇₅	DMAEG CV ₇₅ x 1 .2						
C	DMAEG CV ₇₅ /2. 07	DMAEG CV ₇₅ /1. 73	DMAEG CV ₇₅ /1. 44	DMAEG CV ₇₅ /1. 2	DMAEG CV ₇₅	DMAEG CV ₇₅ x 1 .2						
D												
E	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu	Milieu
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	Acide lactique DL 5 000 µM						DMAEG 120 µM					Vide

APPENDICE IB - ANNEXE 4

Calculs utilisés dans la méthode d'essai LuSens

11. Dans la méthode LuSens, l'équation 1 permet de calculer le **facteur d'induction de l'activité de la luciférase** et la valeur résultante maximale de l'induction (I_{max}) est la moyenne de chacune des répétitions.

$$\text{Équation 1 : } \text{Facteur d'induction} = \frac{(L_{\text{échantillon}} - L_{\text{blanc}})}{(L_{\text{échantillon}} - L_{\text{blanc}})}$$

où

$L_{\text{échantillon}}$ est la luminescence mesurée dans le puits contenant le produit chimique 'testé

L_{blanc} est la luminescence mesurée dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

L_{solvant} est la valeur moyenne de la luminescence mesurée dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant

12. Dans la méthode d'essai LuSens, la **viabilité** est calculée à l'aide de l'équation 2 :

$$\text{Équation 2 : } \text{Viabilité} = \frac{(V_{\text{échantillon}} - V_{\text{blanc}})}{(V_{\text{solvant}} - V_{\text{blanc}})} \times 100$$

où

$V_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance mesurée lors de l'essai au MTT dans le puits contenant le produit chimique testé

V_{blanc} est l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

V_{solvant} est la valeur moyenne de l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant

13. Selon la méthode LuSens, la **concentration correspondant à une viabilité cellulaire de 75 % (CV_{75})** est alors établie par interpolation linéaire en appliquant l'équation 3, et la concentration globale CV_{75} est la moyenne géométrique des réplicats individuels.

$$\text{Équation 3 : } CV_{75} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{75 - V_b}{V_b - V_a} \right) + C_b$$

où

C_a est la concentration d'essai en μM correspondant à une viabilité cellulaire immédiatement supérieure à 75 %

C_b est la concentration d'essai en μM correspondant à une viabilité cellulaire immédiatement inférieure à 75 %

V_a est la viabilité obtenue avec C_a , exprimée en pourcentage

V_b est la viabilité obtenue avec C_b , exprimée en pourcentage

Appendice IC. Sensibilisation cutanée in vitro : essai de sensibilisation cutané (EpiSensA)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. La méthode EpiSensA proposée porte sur le deuxième événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée (1), à savoir l'activation des kératinocytes. Cette méthode fait appel à la quantification des modifications de l'expression des gènes marqueurs associés à l'activation des kératinocytes sur des modèles d'épiderme humain reconstitué (EhR) après exposition à des sensibilisants (2) (3). Deux réponses importantes des kératinocytes se produisent dans l'AOP sensibilisation cutanée : les réponses inflammatoires et l'induction de voies d'expression des gènes cytoprotecteurs (2). L'expression des gènes du facteur-3 activateur de la transcription (*ATF3*) et de l'interleukine 8 (*IL-8*) rend compte de la réponse inflammatoire des kératinocytes, tandis que l'expression des gènes de la protéine GCLM (*glutamate-cysteine ligase modifier subunit*) et de l'homologue de la protéine DnaJ (Hsp40), sous-famille B (*DNAJB4*), rend compte de l'induction de voies d'expression des gènes cytoprotecteurs (3). Dans l'essai EpiSensA, on quantifie les modifications relatives de l'expression des gènes marqueurs (donc *ATF3*, *IL-8*, *GCLM* et *DNAJB4*) en faisant appel à la PCR quantitative après transcription inverse (RT-qPCR). On utilise ensuite ces données pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.

2. La méthode d'essai EpiSensA a fait l'objet d'études de validation (4) suivies d'un examen indépendant par des pairs (12) réalisé par le Centre japonais pour la validation des méthodes de substitution (JaCVAM) en collaboration avec la Coopération internationale relative aux méthodes de substitution à l'expérimentation animale (ICATM) (5). La méthode EpiSensA a été considérée comme scientifiquement valide, dans le cadre d'une IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins d'identification des dangers.

3. Le modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé dans la méthode d'essai EpiSensA est le modèle LabCyte EPI-MODEL24. La méthode EpiSensA est considérée comme une méthode de référence validée (MRV) en ce qui concerne les méthodes d'essai quantifiant les modifications de l'expression des gènes marqueurs associés à l'activation des kératinocytes (*ATF3*, *IL-8*, *GCLM* et *DNAJB4*) au moyen de la PCR quantitative après transcription inverse sur des modèles d'épiderme humain reconstitué (EhR). Des normes de performance (6) ont été établies pour faciliter la validation de méthodes d'essai similaires ou modifiées et permettre de modifier rapidement la présente Ligne directrice afin de les y intégrer. L'ajout d'une méthode d'essai similaire ou modifiée à cette Ligne directrice n'est possible qu'après examen et approbation eu égard au respect de tous les critères décrits dans ces normes de performance. D'autres modèles d'épiderme humain reconstitué peuvent être utilisés après réalisation d'une étude de validation fondée sur les normes de performance.

4. Il a été montré que la méthode d'essai EpiSensA est transférable à des laboratoires expérimentés dans les techniques de cultures cellulaires (4) (5) (8) (9) (10). La reproductibilité intralaboratoire de la méthode EpiSensA a atteint 93.3 % (14/15) dans deux laboratoires participants et 86.7 % (13/15) dans un autre. La reproductibilité interlaboratoire calculée avec trois laboratoires participants pour les analyses de 27 produits chimiques d'essai s'élève à 88.9 % (9). Les résultats issus de l'étude de validation (4) et d'une étude publiée (10) montrent que la précision de la méthode EpiSensA pour distinguer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH de l'ONU) des non-sensibilisants est de 83.3 % (120/144), pour une sensibilité de 88.8 % (95/107) et une spécificité de 67.6 % (25/37), par rapport aux résultats de l'ELGL. La précision équilibrée s'élève à 78.2 %. Par rapport aux résultats obtenus chez l'humain, la précision de la méthode EpiSensA est de 80.7 % (71/88), pour une sensibilité de 98.1 % (53/54) et une spécificité de 52.9 % (18/34). La précision équilibrée s'élève à 75.5 %. Par rapport à l'ELGL, il est probable que les faux négatifs dans les prédictions effectuées avec la méthode EpiSensA concernent davantage des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation cutanée faible à modérée (sous-catégorie 1B du SGH de l'ONU) que des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation cutanée élevée (sous-catégorie 1A) (9). Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode EpiSensA utilisée seule n'ont qu'un caractère indicatif, car les résultats obtenus au moyen de cette méthode doivent être combinés à des informations provenant d'autres sources dans le cadre d'une approche définie ou d'une IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale de la présente LD (11). En outre, quand on utilise des données de référence *in vivo* pour évaluer des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

5. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode EpiSensA est applicable à des produits chimiques représentant un large éventail de groupes fonctionnels organiques, de mécanismes de réaction, de puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et de propriétés physicochimiques (3) (4) (5) (9) (10). La méthode EpiSensA peut être utilisée pour mettre à l'essai des produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable dans un véhicule approprié (voir paragraphe 19 *Sélection du véhicule et évaluation de la solubilité du produit chimique d'essai*). De plus, comme l' EhR est un modèle tridimensionnel comportant une interface air-liquide, les produits chimiques d'essai sont appliqués directement à la surface de ce modèle. Il est donc possible d'avoir recours à des véhicules lipophiles, et la méthode peut être utilisée pour mettre à l'essai des produits chimiques lipophiles (p. ex. $\log K_{ow} > 3.5$) (3) (4) (5) (9) (10). En outre, la méthode EpiSensA permet de classer correctement comme positifs un certain nombre de pro-haptènes supposés (produits chimiques supposés nécessiter une activation enzymatique pour acquérir un potentiel de sensibilisation cutanée) et de pré-haptènes supposés (produits chimiques supposés devenir des sensibilisants à la suite d'une transformation abiotique) (3) (4) (5) (9) (10). La capacité métabolique du RhE et de la peau humaine a fait l'objet d'un nombre limité d'études (12) (13). Ces études suggèrent que les modèles RhE ont une capacité métabolique similaire à celle de la peau humaine, mais d'autres confirmations sont encore nécessaires. Par conséquent, les résultats ne peuvent être utilisés que pour appuyer l'identification des dangers (par exemple, dans le contexte de l'IATA ou d'une approche définie). Il existe cependant des limites liées à la période d'exposition : la méthode

EpiSensA pourrait ne pas détecter les prohaptènes et les préhaptènes nécessitant plus de 6 heures pour être suffisamment métabolisés ou oxydés.

6. Certains tensioactifs peuvent entraîner des faux positifs, dus à l'expression non spécifique des gènes *ATF3* et *IL-8* (4). Par ailleurs, si l'eau distillée est utilisée comme véhicule pour les essais de produits chimiques à des concentrations élevées (100 % ou 50 % (m/v), par exemple), cela peut induire des conditions de stress osmotique élevé, engendrant une expression non spécifique du gène *ATF3* (4). En pareil cas, les résultats positifs doivent donc être interprétés avec prudence. Toutefois, les résultats négatifs peuvent toujours être utilisés pour étayer la classification d'un produit chimique d'essai comme non-sensibilisant. Lorsque la solubilité est évaluée, si le produit chimique n'est pas soluble ou ne forme pas une dispersion stable à 0.0122 % (voir paragraphe 19 *Sélection du véhicule et évaluation de la solubilité du produit chimique d'essai*), la méthode EpiSensA ne peut pas être utilisée pour le mettre à l'essai. Cependant, d'autres véhicules peuvent être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Les produits chimiques d'essai exerçant une influence significative sur l'expression du gène témoin endogène glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) à des concentrations auxquelles la viabilité cellulaire demeure ≥ 80 % (voir paragraphe *Critères d'acceptabilité*) peuvent ne pas entrer dans le domaine d'applicabilité de la méthode, car l'expression du gène marqueur ne peut pas être mesurée avec précision par la quantification relative faisant appel à la RT-qPCR. Il est toutefois possible d'utiliser d'autres gènes témoins endogènes à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Par ailleurs, les produits chimiques d'essai qui ont un effet sur l'ARN en lui-même (p. ex. en induisant une dégradation de l'ARN) ou qui interfèrent directement avec le système d'isolement de l'ARN sont également susceptibles d'être exclus du domaine d'applicabilité de la méthode. S'il est démontré que la méthode EpiSensA ne peut pas s'appliquer à certaines catégories spécifiques de produits chimiques, elle ne doit pas être utilisée pour leur mise à l'essai.

7. En plus d'aider à distinguer les sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU) des non-sensibilisants, la méthode EpiSensA fournit des informations (relation concentration-réponse, par exemple) susceptibles de contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation, dans le cadre d'approches intégrées telles que les approches définies ou la démarche IATA. Des informations complémentaires (s'appuyant de préférence sur des données humaines) sont toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats de la méthode EpiSensA pourraient contribuer à ce type d'évaluation.

8. Les termes sont définis dans l'annexe de l'Introduction générale.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. La méthode EpiSensA est un essai *in vitro* qui quantifie les modifications de l'expression de quatre gènes marqueurs associés à l'activation des kératinocytes (*ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4* et *IL-8*) sur un modèle d'épiderme humain reconstitué après une exposition de 6 heures au produit chimique d'essai d'intérêt. Les modifications relatives de l'expression des gènes marqueurs sont quantifiées à l'aide de la RT-qPCR. La cytotoxicité est également évaluée en parallèle afin de déterminer si la surexpression des gènes marqueurs survient à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité

(viabilité cellulaire $\geq 80\%$). L'induction relative des gènes marqueurs est calculée par rapport aux témoins véhicule. Dans la méthode EpiSensA, les produits chimiques d'essai sont considérés comme positifs si l'expression d'au moins un gène marqueur dépasse sa valeur seuil (*ATF3*, 15 fois ; *GCLM*, 2 fois ; *DNAJB4*, 2 fois ; *IL-8*, 4 fois) pour une viabilité cellulaire demeurant $\geq 80\%$. À cette fin, on détermine la valeur maximale moyenne du facteur d'induction (I_{max}) en utilisant les données associées aux concentrations auxquelles la viabilité cellulaire moyenne reste $\geq 80\%$.

10. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai EpiSensA, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'annexe 1 du présent appendice. Les utilisateurs de la méthode d'essai peuvent consulter l'annexe 2 pour connaître les fourchettes d' I_{max} de chaque gène marqueur obtenues pour les substances de compétence dans les études de validation.

MODE OPÉRATOIRE

11. Le *mode opératoire normalisé de la méthode EpiSensA* est accessible sur le site du système de suivi des méthodes de substitution en voie d'acceptation réglementaire (*Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance – TSAR*) (14) et il convient de l'appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai en laboratoire. Les paragraphes suivants décrivent les principaux éléments et protocoles de la méthode d'essai EpiSensA, qui comprend deux étapes : l'étude de détermination de la concentration et l'étude principale (analyse de l'expression génique).

Caractérisation générale du système d'essai

12. L'épiderme est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés (15). Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) doivent être présentes sous un *stratum corneum* fonctionnel. Le *stratum corneum* doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide de produits chimiques cytotoxiques de référence (on utilise, par exemple, le tensioactif dodécylsulfate de sodium (SDS) pour vérifier la fonction de barrière). Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le *stratum corneum* pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Fonction de barrière

13. Le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué fait en sorte que chaque lot satisfasse aux critères de contrôle de la qualité définis pour la fonction de barrière. La fonction de barrière est démontrée et évaluée en déterminant la concentration à laquelle un produit chimique de référence (p. ex. SDS) réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI50) après un temps d'exposition donné, ou en déterminant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE50) après application du produit

chimique de référence à une concentration fixe déterminée.

Morphologie

14. Le développeur/fournisseur du modèle assure l'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué, qui doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche, comme indiqué au paragraphe 12).

Reproductibilité

15. Le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué doit tenir à jour une base de données avec les résultats des contrôles de qualité effectués pour vérifier la viabilité et la fonction barrière, afin d'en surveiller la reproductibilité au fil du temps. Il est recommandé aux laboratoires utilisant la méthode EpiSensA de conserver une base de données des résultats obtenus avec les témoins positifs et les témoins véhicule (négatifs) afin de suivre la reproductibilité de la méthode au fil du temps.

Contrôle de qualité

16. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la fonction de barrière (paragraphe 13) et à la morphologie (paragraphe 14). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) des valeurs CI50 ou TE50 est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EhR (15). Seuls les résultats obtenus avec des tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour réaliser des prédictions fiables. La plage d'acceptabilité de la méthode d'essai présentée à l'appendice IC est indiquée dans le tableau 1.

Tableau 1. Critères de contrôle de qualité des lots pour les modèles d'épiderme humain reconstitué inclus dans l'appendice IC

Modèle d'EhR	Valeur limite inférieure d'acceptabilité	Valeur limite supérieure d'acceptabilité
LabCyte EPI-MODEL24 (18 heures de traitement par SDS) (13)	Cl ₅₀ = 1.4 mg/mL	Cl ₅₀ = 4.0 mg/mL

Préparation du modèle d'épiderme humain reconstitué

17. On conduit l'essai EpiSensA avec un modèle d'épiderme humain reconstitué. Le kit LabCyte EPI-MODEL24 (#401124), qui peut être obtenu auprès de l'entreprise Japan Tissue Engineering Co., Ltd. (J-TEC), est actuellement le seul modèle susceptible d'être utilisé dans le cadre de la méthode d'essai EpiSensA. Il est possible d'avoir recours à d'autres modèles d'épiderme humain reconstitué après réalisation d'une étude de validation fondée sur les normes de performance (6).

18. Les modèles d'épiderme humain reconstitué sont cultivés à 37 ± 1 °C en atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂, dans le milieu d'essai inclus dans le kit LabCyte EPI-MODEL24 (#401124).

Sélection du véhicule et évaluation de la solubilité du produit chimique d'essai

19. L'évaluation de la solubilité est réalisée avant l'essai. La solubilité de chaque produit chimique est évaluée et confirmée visuellement. À cette fin, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable à une concentration de 50 % dans un véhicule approprié, à savoir : un mélange acétone/huile d'olive, 4:1 (AHO, 20% v/v d'huile d'olive dans l'acétone) en première option (par exemple, on mesure 0.1 g de produit chimique d'essai et on ajoute 0.1 mL de mélange AHO) ; de l'eau distillée (ED) en deuxième option ; ou 50 % v/v d'éthanol dans de l'eau distillée (50 % EtOH) en troisième option. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble ou ne forme pas une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du véhicule en plusieurs phases dans les 10 minutes suivant la préparation à température ambiante) à une concentration de 50 % dans l'un des véhicules, on détermine la concentration soluble la plus élevée en procédant à des dilutions en série de facteur 2, en commençant par 50 % et en descendant jusqu'à 0.0122 %. Si le produit chimique n'est pas soluble ou ne forme pas une dispersion stable à 0.0122 %, il ne peut pas être mis à l'essai à l'aide de la méthode EpiSensA. Le véhicule approprié est défini comme le véhicule dans lequel le produit chimique d'essai se dissout ou forme une dispersion stable à la concentration d'essai la plus élevée. Il convient de vérifier si la concentration la plus élevée déterminée peut être préparée en masse par volume dans une fiole jaugée. S'il est établi que la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée est de 0.0488 %, 0.0244 % ou 0.0122 %, l'étude de détermination de la concentration qui suit (paragraphes 20-26) peut être omise, et l'étude principale réalisée directement (voir paragraphe 27). En cas de recours à un autre véhicule que le mélange acétone/huile d'olive, l'eau distillée ou le mélange composé à 50 % d'éthanol, il convient de fournir une justification scientifique adéquate expliquant ce choix.

Étude de détermination de la concentration

20. On procède à un essai de détermination de la concentration afin de définir les concentrations du produit chimique d'essai à utiliser pour l'étude principale (voir paragraphes *Étude principale (analyse de l'expression génique)*). L'étude principale nécessite des concentrations du produit chimique d'essai auxquelles la viabilité cellulaire moyenne est ≥ 80 %, mais pour un jugement négatif, la viabilité cellulaire moyenne doit être < 80 % à au moins une concentration. Par conséquent, l'étude de détermination de la

concentration consiste à déterminer la concentration la plus faible du produit chimique d'essai induisant une viabilité cellulaire < 80 %.

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins pour l'étude de détermination de la concentration

21. Les produits chimiques d'essai sont préparés le jour de l'essai et dissous ou dispersés de façon stable dans un véhicule approprié à la concentration la plus élevée déterminée, comme indiqué au paragraphe 19. Des dilutions en série de facteur 4 sont préparées à 0.0122 ou 0.0244 % (m/v) dans le véhicule correspondant en commençant par la concentration la plus élevée. Ainsi, en fonction de la concentration de départ, on prépare un nombre variable de dilutions pour l'essai, comme l'illustre le tableau 2. Les véhicules correspondants utilisés pour la préparation des produits chimiques d'essai servent de témoins véhicule. Le témoin tissu non traité et le témoin tissu tué sont utilisés pour le calcul de la viabilité cellulaire. Le témoin tissu non traité est utilisé pour définir une viabilité cellulaire de 100 %, tandis que le témoin tissu tué sert à définir une viabilité cellulaire de 0 % (voir paragraphe 25). Le Triton X-100 est utilisé comme substance témoin pour le témoin tissu tué dans la méthode d'essai EpiSensA. Il doit être préparé sous forme de solution à 10 % (m/v) dans de l'eau distillée. Dans les cas où une substance témoin autre que le Triton X-100 est utilisée comme substance témoin pour le témoin tissu tué, il convient de fournir une justification scientifique appropriée de l'utilisation de cette substance.

Application des produits chimiques d'essai et des témoins dans l'étude de détermination de la concentration

22. Pour chaque produit chimique d'essai, une épreuve est nécessaire afin de déterminer la concentration à utiliser dans l'étude principale (analyse de l'expression génique). Dans l'essai de viabilité cellulaire, on utilise une unité tissulaire (d'épiderme humain reconstitué) pour chaque concentration du produit chimique d'essai et pour le témoin tissu non traité et deux unités tissulaires pour le témoin tissu tué (tableau 2). On applique la solution de travail préparée à partir des produits chimiques d'essai (5 µL) et la solution de Triton X-100 (10 µL) au centre de chaque surface d'épiderme au moyen d'une pipette à déplacement positif et d'embouts de pipette. Les unités tissulaires traitées sont ensuite incubées pendant 6 heures à 37±1 °C en atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

Tableau 2. Exemple de configuration d'une plaque pour l'étude de détermination de la concentration – plaque 24 puits

1. Témoin tissu non traité	2. Témoin tissu tué	3. Témoin tissu tué	13. Produit chimique d'essai B 0.012 % m/v	14. Produit chimique d'essai B 0.049 % m/v	15. Produit chimique d'essai B 0.20 % m/v
4. AHO	5. ED	6. 50 % EtOH	16. Produit chimique d'essai B 0.78 % m/v	17. Produit chimique d'essai B 3.13 % m/v	
7. Produit chimique d'essai A 0.024 % m/v	8. Produit chimique d'essai A 0.098 % m/v	9. Produit chimique d'essai A 0.39 % m/v			
10. Produit chimique d'essai A 1.56 % m/v	11. Produit chimique d'essai A 6.25 % m/v	12. Produit chimique d'essai A 25 % m/v			

AHO : acétone/huile d'olive ; 4:1, v/v

ED : eau distillée

50 % EtOH : 50 % v/v d'éthanol dans de l'eau distillée

Évaluation de la cytotoxicité

23. La viabilité cellulaire est mesurée par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) en utilisant le formazan comme colorant. La LDH est une enzyme cytoplasmique stable présente dans tous les types de cellules ; elle est libérée dans le milieu de culture cellulaire à la suite de l'endommagement de la membrane plasmique. Le dosage de la LDH mesure la quantité de formazan produite par la LDH libérée. Les critères d'interférence du produit chimique d'essai dans l'activité de la LDH (inhibition de la réaction de la LDH) sont décrits sur le site du TSAR (14).

24. Après 6 heures d'exposition, on place 50 µL de milieu pour chaque échantillon dans les puits d'une plaque 96 puits et on ajoute un volume égal (50 µL) de solution de substrat contenant du lactate et du sel de tétrazolium dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, et la réaction est arrêtée en ajoutant 25 µL/puits de 1 mol/L d'acide chlorhydrique (HCl). On mesure ensuite l'absorbance de chaque puits à 490 ou 492 nm ainsi qu'à la longueur d'onde de référence (≥ 600 nm) en utilisant un lecteur de plaque 96 puits adapté. On calcule la variation d'absorbance (Δ abs.) en soustrayant l'absorbance à la longueur d'onde de référence de l'absorbance à 490 ou 492 nm. Il convient de mesurer l'absorbance immédiatement après l'ajout de l'acide chlorhydrique (pas plus d'une heure plus tard).

25. La viabilité cellulaire est calculée à l'aide de la formule ci-après.

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = 100 - \frac{\Delta\text{abs. du produit chimique d'essai} - \Delta\text{abs. du témoin tissu non traité}}{\Delta\text{abs. moyenne du témoin tissu tué} - \Delta\text{abs. du témoin tissu non traité}} \times 100$$

26. Si le dosage de la LDH ne peut pas être utilisé pour un produit chimique d'intérêt, on a recours à un autre essai de cytotoxicité (p. ex. essai MTT ou ATP). Dans l'essai MTT, on mesure l'activation du métabolisme dans une mitochondrie d'une cellule par conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium bleu de thiazolyle ; numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu, mesuré quantitativement après son extraction des tissus. L'essai ATP est une méthode homogène, dans laquelle les tissus sont lysés et le nombre de cellules viables est déterminé en fonction de la quantité d'adénosine triphosphate (ATP) présente dans les tissus. L'ARN total ne peut donc pas être isolé à partir des tissus utilisés dans un essai MTT ou un essai ATP. C'est pourquoi, en cas de recours à un essai MTT ou à un essai ATP, il est nécessaire de disposer de tissus pour l'évaluation de la cytotoxicité en plus des tissus servant à l'analyse de l'expression génique. Il est possible d'utiliser d'autres méthodes (p. ex. essai XTT), à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique sur la base des normes de performance (16).

Étude principale (analyse de l'expression génique)

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins pour l'étude principale

27. Un véhicule approprié (AHO, ED ou 50 % EtOH ; voir paragraphe 19) est utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai ou pour créer une dispersion stable. La concentration la plus faible à laquelle on a obtenu une viabilité cellulaire < 80 % dans l'*étude de détermination de la concentration* sert de concentration la plus élevée (concentration de départ) dans l'*étude principale* pour chaque produit chimique ; elle est aussi utilisée comme critère de prédiction négative (voir paragraphe 39). Si la viabilité cellulaire a été ≥ 80 % à toutes les concentrations d'essai dans l'*étude de détermination de la concentration*, la concentration de départ est la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée du produit chimique d'essai. En fonction de la concentration de départ, on prépare des dilutions en série de facteur 2 en utilisant le véhicule correspondant pour obtenir des solutions de travail. Au moins 3 concentrations sont utilisées, dont la concentration la plus faible ayant entraîné une viabilité cellulaire < 80 % dans l'*étude de détermination de la concentration* ou la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée. Des produits chimiques d'essai qui ne répondent pas à ces conditions peuvent être testés à une ou deux concentrations (c'est-à-dire que la concentration la plus haute dans l'étude principale est de 0.0122 ou 0.0244% (m/v)). Si la concentration déterminée au moment de la vérification de la solubilité est de 0.0244 ou de 0.0122 %, on peut utiliser, respectivement, 2 concentrations seulement (0.0244 et 0.0122 % m/v) ou une seule concentration (0.0122 % m/v). De même, si la concentration la plus faible du produit chimique d'essai induisant une viabilité cellulaire < 80 % est de 0.0244 ou de 0.0122 % dans l'*étude de détermination de la concentration*, on peut utiliser, respectivement, 2 concentrations seulement (0.0244 et 0.0122 % m/v) ou une seule concentration (0.0122 % m/v). Dans ce cas, une réponse positive peut toujours être utilisée pour étayer l'identification du produit chimique testé en

tant que sensibilisateur cutané ; dans le cas contraire, le résultat doit être considéré comme non concluant (voir le paragraphe 39 sur le modèle de prédiction). Le témoin véhicule est préparé comme indiqué au paragraphe 21. Le clotrimazole (n° CAS 23593-75-1, pureté ≥ 98 %) et le bromure de 4-nitrobenzyle (4-NBB) (n° CAS 100-11-8, pureté ≥ 98 %) sont utilisés comme témoins positifs dans la méthode d'essai EpiSensA, et des solutions de clotrimazole à 0.78 % (m/v) et de 4-NBB à 0.10 % (m/v) sont préparées dans un mélange acétone/huile d'olive (solution de travail). Pour calculer la viabilité cellulaire, le témoin tissu non traité et les témoins tissu tué sont préparés comme indiqué au paragraphe 21. Dans les cas où une substance témoin autre que le Triton X-100 est utilisée comme substance témoin pour le témoin tissu tué, il convient de fournir une justification scientifique appropriée de l'utilisation de cette substance.

Application des produits chimiques d'essai et des témoins dans l'étude principale

28. Pour chaque produit chimique d'essai, il faut une épreuve pour obtenir une prédiction. Pour l'analyse de l'expression génique, on utilise trois unités tissulaires pour chaque concentration du produit chimique d'essai ainsi que pour les témoins positifs et les témoins véhicule, deux unités tissulaires pour le témoin tissu tué et une seule pour le témoin tissu non traité. À part le nombre d'unités tissulaires, l'application s'effectue dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe 22 (tableau 3).

Tableau 3. Exemple de configuration d'une plaque pour l'étude principale

1. Témoin tissu non traité	2. Témoin tissu tué	3. Témoin tissu tué	13. Produit chimique d'essai 1.56 % m/v	14. Produit chimique d'essai A 1.56 % m/v	15. Produit chimique d'essai A 1.56 % m/v
4. AHO	5. AHO	6. AHO	16. Produit chimique d'essai A 3.13 % m/v	17. Produit chimique d'essai A 3.13 % m/v	18. Produit chimique d'essai A 3.13 % m/v
7. Clotrimazol e 0.78 % m/v	8. Clotrimazol e 0.78 % m/v	9. Clotrimazol e 0.78 % m/v	19. Produit chimique d'essai A 6.25 % m/v	20. Produit chimique d'essai A 6.25 % m/v	21. Produit chimique d'essai A 6.25 % m/v
10. 4-NBB 0.10 % m/v	11. 4-NBB 0.10 % m/v	12. 4-NBB 0.10 % m/v			

AHO : acétone/huile d'olive ; 4:1, v/v
4-NBB : bromure de 4-nitrobenzyle

Évaluation de la cytotoxicité

29. Après une exposition de 6 heures au produit chimique d'essai, on détermine la viabilité cellulaire, comme indiqué aux paragraphes 23-26.

Isolément de l'ARN

30. Pour l'analyse de l'expression génique, la surface du tissu est lavée trois fois dans 0.5 mL d'une solution saline tamponnée au phosphate, puis le tissu est prélevé et lysé au moyen de l'une des deux méthodes de lyse utilisées lors du développement et de la validation de la méthode d'essai (réactif TRIzol et agitateur vortex, ou colonne de broyage et centrifugeuse).

31. L'ARN total, englobant l'ARNm, est isolé à partir des échantillons tissulaires d'EhR lysés au moyen d'un kit et de réactifs disponibles sur le marché (p. ex. RNeasy Mini Kit, qui a été utilisé pendant le développement et la validation de la méthode d'essai).

32. La concentration d'ARN est quantifiée, et la qualité de l'ARN contenu dans chaque échantillon est analysée à l'aide d'un matériel conçu pour l'analyse de l'ARN, p. ex. NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), en suivant les protocoles du fournisseur du matériel. Il est nécessaire de disposer de plus de 500 ng d'ARN pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). La concentration et la qualité de l'ARN doivent correspondre aux recommandations énoncées par le fournisseur des réactifs utilisés pour la RT-qPCR qui suit (p. ex. concentration d'ARN ≥ 100 ng/ μ L et A260/A280 dans la fourchette 1.8-2.0).

RT-qPCR

33. On synthétise l'ADNc en utilisant des réactifs disponibles dans le commerce (p. ex. Superscript III First-Strand Synthesis System, qui a été utilisé lors du développement et de la validation de la méthode d'essai).

34. Après la synthèse de l'ADNc, on analyse les niveaux d'expression des gènes marqueurs (c'est-à-dire *ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4* et *IL-8*) et du gène témoin endogène (*GAPDH*) au moyen de la RT-qPCR. On utilise la méthode décrite dans le *mode opératoire normalisé EpiSensA* (14) (à savoir TaqMan Gene Expression Assay et TaqMan Universal PCR Master Mix). Il est possible d'avoir recours à un autre réactif pour l'analyse de l'expression génique à condition de pouvoir fournir une justification scientifique adéquate expliquant ce choix. D'autres méthodes permettant de quantifier les changements d'expression génique peuvent être utilisées, à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique sur la base des normes de performance (6).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

35. L'expression génique relative est analysée au moyen de la RT-qPCR. Sur la base de la valeur de cycle seuil (Ct), on calcule les valeurs ΔCt et $\Delta\Delta Ct$ ainsi que le facteur multiplicatif de l'induction comme suit.

$$\text{Valeur } \Delta Ct \text{ du gène marqueur} = \text{valeur Ct du gène marqueur} - \text{valeur Ct de GAPDH}$$

$$\text{Valeur } \Delta\Delta Ct \text{ du gène marqueur} = \text{valeur } \Delta Ct \text{ du gène marqueur} - \text{valeur } \Delta Ct \text{ du gène marqueur (témoin véhicule)}$$

$$\text{Facteur multiplicatif de l'induction} = 2^{-\text{valeur } \Delta\Delta Ct \text{ du gène marqueur}}$$

La viabilité cellulaire est aussi calculée, suivant l'équation indiquée au paragraphe 25.

Critères d'acceptabilité

36. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis pour qu'une épreuve soit considérée comme valide.

- La viabilité cellulaire d'au moins deux unités tissulaires du témoin véhicule est $\geq 95\%$. Si la viabilité cellulaire d'un seul témoin véhicule est $< 95\%$, on utilise les valeurs Ct obtenues à partir des deux unités tissulaires restantes.
- La viabilité cellulaire moyenne des deux témoins positifs (clotrimazole à 0.78 % [m/v] et 4-NBB à 0.10 % [m/v]) doit être $\geq 80\%$.
- Pour le témoin positif clotrimazole à 0.78 % [m/v], les valeurs moyennes du facteur multiplicatif de l'induction pour *ATF3* et *IL-8* doivent dépasser la valeur seuil (c'est-à-dire que la valeur du facteur multiplicatif de l'induction doit être > 15 pour *ATF3* et > 4 pour *IL-8*).
- Pour le témoin positif 4-NBB à 0.10 % [m/v], les valeurs moyennes du facteur multiplicatif de l'induction pour *GCLM* et *DNAJB4* doivent dépasser la valeur seuil (c'est-à-dire que la valeur du facteur multiplicatif de l'induction doit être > 2 pour *GCLM* et > 2 pour *DNAJB4*).

37. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis pour que le résultat d'une concentration d'essai soit jugé valide.

- Le résultat d'au moins une concentration d'essai présente une viabilité cellulaire moyenne $\geq 80\%$. Si la viabilité cellulaire moyenne est $< 80\%$ pour une concentration d'essai donnée, le résultat obtenu avec cette concentration d'essai doit être exclu pour une prédiction positive (voir cas particulier paragraphe 42), mais peut être utilisé pour une prédiction négative (voir paragraphe 39).

- Lorsque la valeur Ct moyenne de *GAPDH* pour une concentration donnée de produit chimique d'essai se situe à ± 1 de la valeur Ct moyenne de *GAPDH* du témoin véhicule correspondant, le résultat obtenu à cette concentration est acceptable.

Modèle prédictif

38. Pour établir une prédiction (positive ou négative), on évalue chaque produit chimique d'essai en conduisant une épreuve. La prédiction obtenue avec EpiSensA est jugée positive si au moins l'une des conditions suivantes est remplie.

- I_{max} pour *ATF3* est > 15 pour au moins une concentration d'essai.
- I_{max} pour *GCLM* est > 2 pour au moins une concentration d'essai.
- I_{max} pour *DNAJB4* est > 2 pour au moins une concentration d'essai.
- I_{max} pour *IL-8* est > 4 pour au moins une concentration d'essai.

39. La prédiction obtenue avec EpiSensA est considérée comme négative si les trois conditions ci-dessous sont remplies :

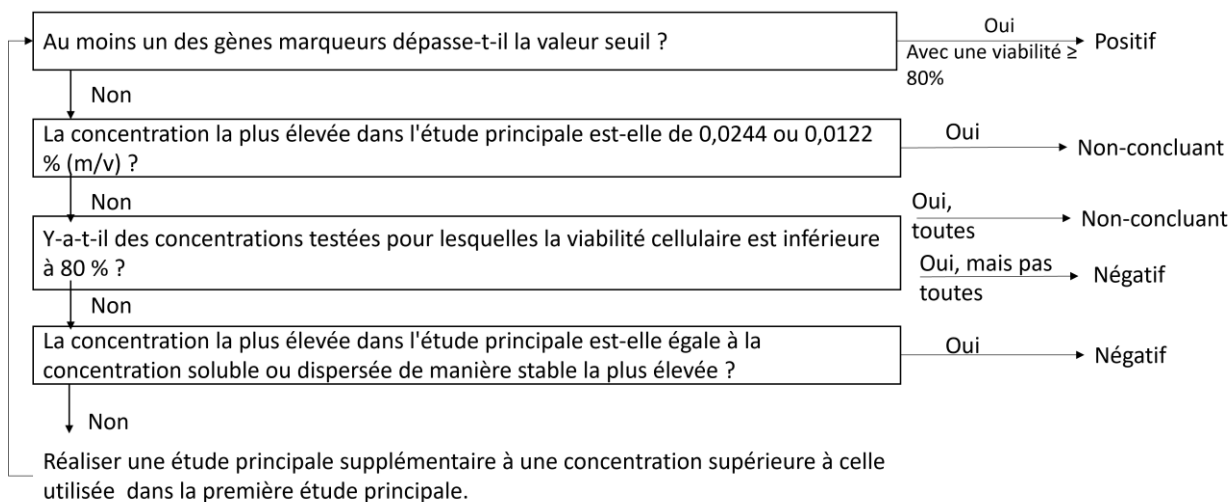
- la valeur moyenne du facteur multiplicatif de l'induction des gènes marqueurs ne dépasse pas les valeurs seuils respectives, pour aucun des quatre gènes, et ce, à aucune des concentrations d'essai ;
- au moins trois concentrations ont été testées et
- au moins l'une des concentrations d'essai engendre une viabilité cellulaire moyenne < 80 %.

Si la plus forte concentration testée de l'étude principale est de 0,0244 ou 0,0122% (m/v), le résultat ne sera pas considéré comme négatif mais comme non concluant (voir paragraphe 27).

40. Il peut arriver que la valeur moyenne du facteur multiplicatif de l'induction des quatre gènes marqueurs ne dépasse pas les valeurs seuils respectives à la concentration d'essai, mais que la viabilité cellulaire moyenne à toutes les concentrations d'essai soit ≥ 80 %. En pareil cas, si la concentration la plus élevée testée dans l'étude principale est égale à la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée, le résultat du produit chimique d'essai est jugé négatif. En revanche, si la concentration la plus élevée testée dans l'étude principale est inférieure à la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée, on procède à une étude principale supplémentaire avec des dilutions en série de facteur 2, en commençant par la concentration supérieure à la concentration la plus élevée utilisée dans la première étude principale (figure 1). Dans cette étude principale supplémentaire, si le produit chimique d'essai n'engendre pas une viabilité cellulaire moyenne < 80 % à la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée (pour les produits solides) ou à 100 % (pour les liquides), le résultat obtenu pour ce produit chimique est considéré comme négatif.

41. Si toutes les viabilités cellulaires moyennes sont < 80 % aux concentrations d'essai supérieures ou égales à 0.0122 % (m/v), la prédiction est jugée non concluante.

Figure 1 : Bref organigramme du modèle de prédiction EpiSensA.



42. D'autres cas peuvent survenir, dans lesquels la valeur du facteur multiplicatif de l'induction d'un gène marqueur dépasse la valeur seuil uniquement à la concentration la plus faible présentant une viabilité cellulaire moyenne < 80 %. En pareil cas, on met à nouveau le produit chimique à l'essai en utilisant une fenêtre plus étroite d'analyse de la relation concentration-réponse et un facteur de dilution plus faible (p. ex. $\sqrt{2}$ [= 1.41]) afin de déterminer si l'induction s'est produite à un niveau cytotoxique (viabilité cellulaire moyenne de 80 à 95 %).

Rapport d'essai

43. Le rapport d'essai contient les informations suivantes.

Produit chimique d'essai

- Substance monoconstituant
- Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants tels que lot/numéro de lot et date de péremption ;
- apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- pureté, identité chimique des impuretés, etc., s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent ;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) d'essai ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- justification du choix du véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

- Substance multiconstituant, 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 physicochimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;
- apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physicochimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) d'essai ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- justification du choix du véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Témoins

- Témoin positif
 - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
 - apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
 - pureté, identité chimique des impuretés, etc., s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent ;
 - traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
 - concentration(s) d'essai ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Témoin véhicule
 - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;
 - pureté, identité chimique des impuretés, etc., s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent ;
 - apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques pertinentes, si des témoins véhicule autres que ceux mentionnés dans cet appendice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - justification du choix du véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions de l'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- description de la méthode d'essai utilisée ;
- modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot) ;
- lecteur de plaque 96 puits équipé pour mesurer la densité optique à 490 (ou 492 nm) et ≥ 600 nm ;
- méthode d'extraction de l'ARN employée ;
- spectrophotomètre pour mesure de la concentration d'ARN ;
- thermocycleur et système RT-qPCR utilisés (p. ex. modèle), y compris paramétrage des appareils, amorces et réactifs de transcription inverse (RT) et PCR ;
- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative) : acceptabilité des données de contrôle de qualité par rapport aux données historiques des lots ;
- déclaration relative à la procédure appliquée par le laboratoire pour faire la preuve de sa compétence à mettre en œuvre la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour démontrer la reproductibilité de l'application de la méthode d'essai au fil du temps.

Mode opératoire

- Concentration des produits chimiques d'essai, procédure d'application et durée d'exposition (si celles-ci diffèrent des recommandations) ;
- description des critères d'évaluation et de décision appliqués ;
- description des critères d'acceptabilité de l'étude utilisés ;
- description de toute modification apportée au mode opératoire.

Résultats

- Tableau des données, y compris valeurs individuelles Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct ainsi que valeurs du facteur multiplicatif de l'induction et de viabilité cellulaire obtenues pour le produit chimique d'essai et pour le témoin positif, et indication de l'évaluation du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif ;
- graphique représentant les courbes concentration-réponse pour l'induction de l'expression génique et la viabilité cellulaire ;
- description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- Discussion des résultats obtenus avec la méthode EpiSensA.

Conclusions

LITERATURE

- (1) OECD (2012)10/PART1. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Part 1: Scientific evidence. Series on Testing and Assessment. ENV/JM. Mono, 168.
- (2) Saito, K., Nukada, Y., Takenouchi, O., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2013). Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicology in Vitro*, 8, 2213-24, doi: 10.1016/j.tiv.2013.08.007.
- (3) Saito, K., Takenouchi, O., Nukada, Y., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2017). An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicology in Vitro*, 40, 11-25. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.005.
- (4) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (5) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (6) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (7) OECD (2005), OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.
- (8) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between-laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential in vitro: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.
- (9) Mizumachi, H., Watanabe, M., Ikezumi, M., Kajiwara, M., Yasuda, M., Mizuno, M., Imai, N., Sakuma, M., Shibata, M., Watanabe, S., Motoyama, J., Basketter, D., Eskes, C., Hoffmann, S., Lehman, D., Ashikaga, T., Sozu, T., Takeyoshi, M., Suzuki, S., Miyazawa, M., Kojima, H. (2024), The inter-laboratory validation study of EpiSensA for predicting skin sensitization potential. *Journal of Applied Toxicology*, 44(4), 510-525. doi: 10.1002/jat.4559.
- (10) Mizumachi, H., Suzuki, S., Sakuma, M., Natsui, M., Imai, N., Miyazawa, M. (2024), Reconstructed human epidermis-based Testing Strategy of skin sensitization hazard and potency classification using EpiSensA and *in silico* data. *Journal of Applied Toxicology*, 44(3), 415-427. doi: 10.1002/jat.4551

- (11) OECD (2023), *Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>
- (12) Kazem, S., Linssen, EC., Gibbs, S. (2019). Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: a short review. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1899-1910, doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.002..
- (13) Oesch, F., Fabian, E., Landsiedel, R. (2018). Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2411-2456. doi: 10.1007/s00204-018-2232-x.
- (14) EURL ECVAM. (2023). EpiSensA standard operating procedure. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2018-01-0>.
- (15) OECD (2021), *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>

APPENDICE 1C - ANNEXE 1 - SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in vitro* : essai de sensibilisation cutanée (EpiSensA)

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente annexe de la Ligne directrice 442D, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en appliquant la méthode à au moins trois des quatre concentrations fixes définies pour les dix substances d'épreuve recommandées au tableau 1. Les résultats obtenus pour chaque gène marqueur doivent concorder avec ceux indiqués dans le tableau 1 pour 8 des 10 substances d'épreuve. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont le fait que les substances sont disponibles dans le commerce, qu'il existe des données de référence *in vivo* post-curation et des données de haute qualité obtenues à l'aide de la méthode EpiSensA, et que les substances ont été utilisées dans l'étude circulaire de prévalidation ou dans l'étude de validation coordonnée par le JaCVAM.

Tableau 1. Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode EpiSensA

N°	Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> ¹	Véhicule	Concentration d'essai (% m/v)	Résultats EpiSensA pour chaque gène marqueur ²			
							ATF3	GCLM	DNAJB4	IL-8
1	2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (Cat. SGH 1A)	AHO	0.39, 0.20, 0.10, 0.05	p	p	p	p/n
2	p-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (Cat. SGH 1A)	AHO	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	p/n	p	p	p/n
3	Heptine carbonate de méthyle	111-12-6	Liquide	Sensibilisant (Cat. SGH 1A)	AHO	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p
4	Metol	55-55-0	Solide	Sensibilisant (Cat. SGH 1A)	ED	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p/n
5	Acide abiétique	514-10-3	Solide	Sensibilisant (Cat. SGH 1B)	AHO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p	p	p
6	Farnésol	4602-84-0	Liquide	Sensibilisant (Cat. SGH 1B)	AHO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p/n	p	p
7	Aldéhyde amyl cinnamique	122-40-7	Liquide	Sensibilisant (Cat. SGH 1B)	AHO	100, 50, 25, 12.5	p	n	p	p
8	Cétrimide	57-09-0	Solide	Non-sensibilisant (Non classé)	50 % EtOH	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	n	n	n	n
9	Acide lactique ³	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant (Non classé)	ED	6.25, 3.13, 1.56, 0.78	n	n	n	n
10	Hexane	110-54-3	Liquide	Non-sensibilisant (Non classé)	AHO	100, 50, 25	n	n	n	n

¹ Prédiction de danger et de puissance *in vivo* d'après les données ELGL (LD 497, annexe 3 du *Supporting document*) (Urbisch, 2015). La puissance *in vivo* est déterminée d'après les critères de sous-catégorisation du SGH de l'ONU.

² « p » indique que le facteur multiplicatif de l'induction du gène marqueur dépasse la valeur seuil avec une viabilité $\geq 80\%$; « n » indique que le facteur multiplicatif de l'induction du gène marqueur ne dépasse pas la valeur seuil avec une viabilité $\geq 80\%$; « p/n » signifie que « p » et

« n » sont tous deux acceptables.

³ Il convient d'effectuer un essai MTT au lieu d'un dosage de la LDH.

APPENDICE 1C - ANNEXE 2 - Plages I_{max} pour les substances d'épreuve de compétence

Ces valeurs sont fournies à titre d'information et reflètent les fourchettes obtenues par les laboratoires dans le cadre de l'étude de validation (1) et de l'étude circulaire de prévalidation (2). Ces fourchettes ne font pas partie de la Ligne directrice mais peuvent être utiles pour un laboratoire qui met en place la méthode EpiSensA pour la première fois avant une utilisation de routine.

Tableau 1: Plages d'I_{max} de chaque gène marqueur obtenues pour les substances d'épreuve de compétence dans les études de validation

No.	Substances de compétence	CAS No.	Prediction ¹ in vivo	N ²	Plages I _{max} pour les substances de compétence			
					ATF3	GCLM	DNAJB4	IL-8
1	2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Sensibilisant (GHS Cat. 1A)	9	30.4-133.2	6.4-18.9	6.2-17.3	2.9-5.9
2	p-Phenylenediamine	106-50-3	Sensibilisant (GHS Cat. 1A)	8	2.4-66.1	11.1-24.3	4.6-22.3	0.8-3.5
3	Heptane carbonate de méthyle	111-12-6	Sensibilisant (GHS Cat. 1A)	8	113.9-823	9.5-84	40.8-175.7	9.5-74.4
4	Metol	55-55-0	Sensibilisant (GHS Cat. 1A)	9	130.7-460.5	11.6-22.6	16.6-35.9	3.2-8.0
5	Acide abiétique	514-10-3	Sensibilisant (GHS Cat. 1B)	7	74-410	2.9-4.9	2.9-5.8	39.4-153.9
6	Farnésol	4602-84-0	Sensibilisant (GHS Cat. 1B)	7	48.4-378.2	0.7-5.3	2.9-5.8	90.4-547.9
7	Aldéhyde amyl cinnamique	122-40-7	Sensibilisant (GHS Cat. 1B)	3	116.1-250.7	1-1.3	3.1-5.2	163.8-265.5
8	Cétrimide	57-09-0	Non Sensibilisant (Non classé)	9	1.2-8.3	0.6-1.4	0.6-1.4	1.6-3.0
9	Acide lactique	50-21-5	Non- Sensibilisant (Non classé)	7	1.1-2.5	1.1-1.5	0.9-1.2	1.5-3.1
10	Hexane	110-54-3	Non- Sensibilisant (Non classé)	9	1.4-5.6	0.7-1.8	0.7-1.3	1-1.7

¹: La prédiction du danger et de la puissance in vivo est basée sur les données LLNA. (LD497, SD Annexe 3) (Urbisch, 2015). La puissance in vivo est calculée en utilisant les critères basés sur la sous-catégorisation du SGH de l'ONU.

²: Le nombre de résultats EpiSensA pour calculer l'intervalle I_{max}.

- (1) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (2) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between-laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential in vitro: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.