



**Section 4**  
Effets sur la santé

## Ligne directrice n° 442C

### Sensibilisation cutanée *in chemico*

*Essai portant sur l'événement clé relatif à l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines, 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 chemico portant sur l'événement clé relatif à l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines, dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables**

## INTRODUCTION

### **Ligne directrice d'essai fondé sur l'événement clé relatif à l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines**

1. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à 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 de l'ONU) (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 d'un événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont les dermatites de contact allergiques, en passant par des étapes intermédiaires. Cette AOP concerne les produits chimiques qui réagissent avec les résidus d'acides aminés (donc avec la cystéine ou la lysine), tels que les produits 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. Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques, pratiquées sur des cobayes – test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et test de Buehler (LD 406 de l'OCDE) (11) –, évaluent les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Les essais chez la souris – l'ELGL (LD 429 de l'OCDE) (12) et ses trois variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL : DA (LD 442A de l'OCDE) (13) ainsi que l'ELGL : BrdU-ELISA et BrdU-FCM (LD 442B de l'OCDE) (14) – évaluent la réponse exclusivement au stade de l'induction. 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.

© OCDE (2024)

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

3. Les méthodes mécanistiques d'essai *in chemico* et *in vitro* portant 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 présente Ligne directrice évalue l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines et porte sur le premier événement clé ; la LD 442D de l'OCDE évalue l'activation des kératinocytes (15), correspondant au deuxième événement clé, tandis que la LD 442E de l'OCDE s'intéresse à l'activation des cellules dendritiques (16), troisième événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée. 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 (12).

### Fondements et principes des méthodes d'essai incluses dans la Ligne directrice d'essai fondé sur les événements clés

4. La présente Ligne directrice (LD) décrit les essais *in chemico* portant sur les mécanismes du premier événement clé de l'AOP sensibilisation cutanée, à savoir l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines (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 deux méthodes d'essai :

- L'essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA) (appendice I),
- L'essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés (Amino acid Derivative Reactivity Assay, ADRA) (appendice II),
- L'essai cinétique de liaison directe sur la réactivité peptidique (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay, kDPRA) (appendice III).

5. Ces méthodes d'essai *in chemico* fondées sur l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines sont considérées comme scientifiquement validées. Le DPRA a fait l'objet d'une étude de validation du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM), suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) (3) (4) (5). L'ADRA a fait l'objet d'une étude de validation coordonnée par le Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (6) (7) (8) (9), suivie d'un examen indépendant par des pairs (10). Le kDPRA a fait l'objet d'une étude de validation coordonnée par l'industrie, suivie d'un examen indépendant par des pairs (17).

6. La corrélation entre la réactivité aux protéines et le pouvoir de sensibilisation cutanée est bien établie (18) (19) (20). Cependant, dans la mesure où la réactivité aux protéines n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée (2) (21), 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. Les données obtenues par les méthodes d'essai décrites dans la présente LD sont donc proposées dans le cadre d'une approche intégrée (IATA), en complément d'autres informations 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 modélisation *in silico* et la prévision à partir de données croisées (read-across) relatives à des produits chimiques similaires (21). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données obtenues par 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 (21), et ont été mises en œuvre dans la Ligne directrice OCDE

497 sur les approches définies sur la sensibilisation cutanée (22). Si l'intention est d'utiliser les données de ces méthodes dans une approche définie sur la sensibilisation cutanée, il faut alors se référer à la Ligne directrice LD 497 pour appliquer les plages de valeurs limites ou toute autre procédure d'interprétation des données (22). Pour plus de détails sur l'application des plages de valeurs limites, il faut se référer à la Figure 1 de l'Appendice I.

7. Les méthodes d'essai comprises dans la présente Ligne directrice peuvent présenter des différences dans les procédures, le domaine d'applicabilité, et les limitations, mais chacune des méthodes peut être utilisée pour satisfaire aux exigences réglementaires des pays pour des résultats d'essai sur la réactivité des protéines, tout en bénéficiant de l'Acceptation Mutuelle des Données. Dans le contexte d'Approches Définies (ADs), les méthodes ne sont pas automatiquement interchangeables ; il est spécifié dans la LD 497 quelles sont les méthodes/combinaisons de méthodes à utiliser.

8. Les DPRA et ADRA, décrits dans les Appendices I et II de cette LD permettent respectivement de distinguer les sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU) des non-sensibilisants. En fonction du cadre réglementaire applicable, des résultats positifs obtenus par ces méthodes peuvent être considérés comme suffisants à eux seuls pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU. Cependant, ces méthodes d'essai ne permettent pas à elles seules la sous-catégorisation des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B (22) du SGH de l'ONU (1), pour les autorités mettant en œuvre ces deux sous-catégories optionnelles, ou une prédiction de puissance pour les décisions relatives à l'évaluation de la sécurité.

9. À l'inverse, le kDPRA décrit dans l'Appendice III de la présente LD, permet de distinguer les sensibilisants cutanés de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU de ceux qui ne sont pas sous-catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A), c'est-à-dire ceux de la sous-catégorie 1B (sous-catégorie 1B) du SGH de l'ONU ou non classés (1) ; mais il ne permet pas de distinguer les sensibilisants (Catégorie 1) des non-sensibilisants. En fonction du cadre réglementaire applicable, des résultats positifs obtenus avec le kDPRA peuvent être considérés comme suffisants à eux seuls pour classer un produit chimique dans la catégorie 1A du SGH de l'ONU.

10. Les définitions sont données en annexe. Des standards de performance ont été développés pour l'évaluation de proposition de méthodes similaires ou modifiées comparées aux méthodes d'essai pour la sensibilisation cutanée *in vitro* DPRA ou ADRA (23).

## Références de l'introduction

- (1) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Ninth revised edition, UN New York and Geneva, 2021. Available at: [https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS\\_Rev9F.pdf](https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9F.pdf)
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. 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) GF Gerberick, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci.* 81, 332-343.
- (4) GF Gerberick, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci.* 97, 417-427.
- (5) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for the skin sensitisation testing Available at: [https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendaion-on-the-directpeptide-reactivity-assay-dpra](https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendaion-on-the-directpeptide-reactivity-assay-dpra).
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 70, 94-105.
- (7) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T, Fujita M.(2015) A novel in chemico method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions. *J Appl Toxicol.* 35, 1348-1360.
- (8) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *J. Appl. Toxicology*, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (9) OECD (2019), Validation study report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA). Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) OECD (2019). Report of the Peer Review Panel of the Validation of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) –. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (11) OECD (1992,2021), Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd,https://doi.org/env/testguidelines>].10.1787/9789264070660-en.
- (12) OECD (2010), OECD Guidelines for Chemical Testing Test No. 429.: Skin sensitisationSensitisation: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and DevelopmentAssay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd,https://doi.org/env/testguidelines>].10.1787/9789264071100-en.
- (13) OECD (2010), OECD Guidelines for Chemical Testing Test No. 442A.: Skin sensitisationSensitization: Local Lymph Node assayAssay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd,https://doi.org/env/testguidelines>].10.1787/9789264090972-en.
- (14) OECD (2018), OECD Guidelines for Chemical Testing Test No. 442B.: Skin sensitisationSensitization: Local Lymph Node assayAssay: BrdU-ELISA or –FCM. Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd,https://doi.org/env/testguidelines>].10.1787/9789264090996-en.
- (15) OECD (2018), OECD Key Event based test GuidelineTest No. 442D: In vitroVitro Skin Sensitisation Assays Addressing AOP Key Event on Keratinocyte Activation. Organisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for Economic Cooperation and Developmentthe Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd,https://doi.org/env/testguidelines>].10.1787/9789264229822-en.
- (16) OECD (2018), OECD Key event based test GuidelineTest No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on Activationactivation of Dendritic Cellsdendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd,https://doi.org/env/testguidelines>].10.1787/9789264264359-en.
- (17) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A. (2020), 'The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial', ALTEX, preprint, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (18) Landsteiner and Jacobs (1936), Studies on the sensitisation of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

- (19) Dupuis and Benezra (1982), Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (20) JP Lepoittevin, Basketter DA, Goossens A, Karlberg AT (1998), Allergic contact dermatitis: the molecular basis, Springer, Berlin (doi: 10.1007/978-3-642-80331-4).
- (21) OECD (2016). 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. Series on Testing & Assessment No. 256. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) OECD (2021), 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>.
- (23) B Wareing, Urbisch D, Kolle SN, Honarvar N, Sauer UG, Mehling A, Landsiedel R(2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data, Toxicol In vitro Dec;45(Pt 1):134-145 (doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.015).
- (24) OECD (2022), Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation DPRA and ADRA test methods, Series on Testing & Assessment No. 303, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

## ANNEXE - DÉFINITIONS

**Adéquation du système** : détermination des performances des instruments (sensibilité, par exemple) par l'analyse d'étalons de référence préalablement à la mise à l'épreuve du lot analytique (7).

**ADRA** : Amino acid Derivative Reactivity Assay (essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés)

**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).

**Approche définie (Defined Approach, DA)** : une approche définie est une procédure établie d'interprétation des données (modèles statistiques, mathématiques, par exemple), appliquée à des données (prédictions *in silico*, données *in chemico*, *in vitro*, par exemple) issues d'un ensemble défini de sources d'information à des fins de prédiction.

**Calculs****Calcul de la capacité prédictive**

La sensibilité, la spécificité et la précision, et la précision pondérée sont calculées sur la base de la valeur des vrais positifs (VP), vrais négatifs (VN), faux négatifs (FN) et faux positifs (FP), tel que décrit ci-dessous. Sensibilité : nombre de vrais positifs ÷ nombre total de produits chimiques positifs,  $VP \div (VP + FN) \times 100$

Spécificité : nombre de vrais négatifs ÷ nombre total de produits chimiques négatifs,  $VN \div (VN + FP) \times 100$

Précision : nombre de prédictions correctes ÷ nombre total de prédictions,  $(VN + VP) \div (VN + VP + FN + FP) \times 100$

Précision pondérée : (sensibilité+spécificité)/2

**Calcul de la déplétion de NAC ou NAL**

La déplétion est calculée comme suit :

Taux de déplétion de NAC ou NAL =  $\{1 - (\text{aire du pic NAC ou NAL observé après injection d'un réplicat} \div \text{aire moyenne des pics NAC ou NAL chez les témoins de référence C})\} \times 100$

**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.

**Courbe d'étalonnage** : relation entre la réponse expérimentale et la concentration analytique (aussi appelée courbe étalon) d'une substance d'essai connue.

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

**DPRA** (Direct Peptide Reactivity Assay) : essai de liaison directe sur la réactivité peptidique

**EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique.

**ELGL** : essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques, publié en 2010 (LD 429 de l'OCDE)

**EURL ECVAM** : Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la validation de méthodes alternatives

**Précision pondérée** : moyenne de la sensibilité et de la spécificité. Cette mesure est particulièrement utile lorsqu'un nombre différent de produits chimiques testés donnent des résultats positifs *in vivo* et négatifs *in vivo*. C'est une considération importante dans l'évaluation de la pertinence de la méthode. La formule utilisée pour calculer la précision pondérée est détaillée dans « Calcul » de la capacité prédictive.

**Événement moléculaire initiateur** : perturbation d'un système biologique induite par un produit chimique au niveau moléculaire, identifiée comme le point de départ de la voie impliquée dans un effet indésirable (AOP).

**Fiabilité** : indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (1).

**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 les dangers potentiels, les risques ou la nécessité d'effectuer des tests complémentaires ciblés et donc limités à un minimum.

**JaCVAM** : Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives

**kDPRA**: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay.

**k<sub>max</sub>**: c'est la constante de vitesse maximale (en s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>) déterminée à partir de la vitesse de réaction d'une substance testée avec the kDPRA voir (Appendix III, paragraphe 24).

**Mélange** : solide ou liquide constitué d'au moins deux substances qui ne réagissent pas chimiquement l'une avec l'autre (3).

**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 (1).

**NAC** : N-(2-(1-naphtyl)acétyl)-L-cystéine (4) (5) (6)

**NAL** : α-N-(2-(1-naphtyl)acétyl)-L-lysine (4) (5) (6)

**Pertinence** : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (1).

**Précision** : degré de conformité entre les résultats d'une 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. Le terme est souvent utilisé de façon interchangeable avec le terme « concordance » pour désigner la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (1). La formule utilisée pour obtenir la précision est indiquée sous « Calcul de la capacité prédictive »

**Pré-haptènes** : produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique.

**Produit chimique d'essai** : désigne ce qui est testé.

**Pro-haptènes** : produits chimiques acquérant un pouvoir sensibilisant pour la peau suite à une activation enzymatique.

**Reproductibilité** : concordance des résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur la même substance selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (1).

**Sensibilité** : proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (1). La formule utilisée pour obtenir la sensibilité est indiquée sous « Calcul de la capacité prédictive »

**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 (3).

**Spécificité** : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (1). La formule utilisée pour obtenir la spécificité est indiquée sous « Calcul de la capacité prédictive »

**Substance** : un élément chimique et ses composés 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 (3).

**Substance mono-constituant** : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal constitue au moins 80 % (P/P) de l'ensemble.

**Substance multi-constituants** : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle au moins deux constituants principaux sont présents à des concentrations  $\geq 10$  % (P/P) et  $< 80$  % (P/P). Les substances multi-constituants sont obtenues grâce à un procédé de production. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange comprend au moins deux substances qui ne réagissent pas chimiquement entre elles, alors qu'une substance multi-constituants comprend au moins deux substances qui réagissent chimiquement.

**Témoin de référence** : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou le véhicule utilisé pour préparer les échantillons traités ou non avec le produit chimique d'essai, et servant à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif simultané, cet échantillon indique également si le solvant ou le véhicule interagit avec le système d'essai.

**Témoin positif** : répliquat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

**TFA** : acide trifluoroacétique.

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

### Références des définitions

- (1) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (2) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Ninth revised edition, UN New York and Geneva, 2021. Available at: [https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS\\_Rev9F.pdf](https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9F.pdf)
- (4) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 70:94-105.
- (5) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel in chemico method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35(11):1348-60, (doi: 10.1002/jat.3139).
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *J. Appl. Toxicology*, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (7) FDA (Food and Drug Administration) (2018), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 41pp. Accessible at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

## APPENDICE 1

Sensibilisation cutanée *in chemico* : essai de liaison directe sur la réactivité peptidique  
(Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA)

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

1. La méthode d'essai DPRA est proposée pour l'étude de l'événement moléculaire initiateur dans l'AOP sensibilisation cutanée – à savoir la réactivité aux protéines – par quantification de la réactivité des produits chimiques testés vis-à-vis de modèles peptidiques de synthèse contenant soit de la lysine, soit de la cystéine (1). Les taux de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite utilisés pour classer les substances dans l'une des quatre classes de réactivité, afin d'aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés (2).
2. La transférabilité de la méthode d'essai DPRA à des laboratoires expérimentés dans le domaine de la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) a été démontrée. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par la méthode d'essai sont de l'ordre de 85% intra-laboratoire et 80% inter-laboratoires (3). Dans l'ensemble, les résultats issus de l'étude de validation (4) et des études publiées (5) montrent que la précision de la méthode DPRA pour distinguer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH) des non-sensibilisants est de 80 % (N=157), pour une sensibilité de 80 % (88/109) et une spécificité de 77 % (37/48), par comparaison avec les résultats obtenus par l'ELGL (LLNA en anglais). La méthode DPRA est susceptible de sous-prédire des produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau faible à modéré (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH) par rapport aux produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau élevé (c'est-à-dire sous-catégorie 1A) (5). Cependant, les valeurs relatives à la précision du DPRA utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA ou d'une approche définie, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 6 et 8 de l'Introduction générale. Au demeurant, 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'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain. Les données actuellement disponibles montrent que le DPRA 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 (2) (3) (5). L'ensemble de ces données montre l'utilité du DPRA comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée.
3. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé, et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode DPRA aux substances et/ou aux mélanges (voir un résumé des limites connues du DPRA dans l'Annexe 1 du présent Appendice). La présente méthode d'essai n'est pas applicable à l'essai des composés métalliques, qui sont connus pour réagir avec les protéines par des mécanismes autres que la liaison covalente. Les produits chimiques d'essai doivent être solubles dans un solvant approprié à une concentration finale de 100 mM (voir paragraphes 10 et 11). Toutefois, les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent être testés à des concentrations plus basses

auxquelles ils sont solubles. Dans ce cas, un résultat positif pourra quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité du DPRA à des mélanges de composition connue (5). On considère néanmoins que le DPRA est techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges de composition connue (voir paragraphes 4 et 11). Avant d'appliquer la Ligne directrice à des mélanges, à des produits chimiques et substances difficile à tester (parce qu'instables, par exemple) ou à des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cet appendice de la Ligne directrice, il convient donc d'examiner si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode d'essai ne peut s'appliquer à des catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester les catégories en question.

4. La méthode d'essai décrite dans le présent appendice de la Ligne directrice est une méthode *in chemico*, qui ne fait pas intervenir de système métabolique. Elle ne permet pas d'identifier les produits chimiques requérant une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée (pro-haptènes). Les produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) apparaissent le plus souvent correctement identifiés par la méthode d'essai (4) (9) (10). A la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs obtenus par la méthode d'essai devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et en lien avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA ou d'une approche définie. Les produits chimiques qui ne se lient pas de façon covalente au peptide mais qui facilite son oxydation (p.ex. la dimerisation de la cystéine) peuvent amener à une surestimation potentielle de la déplétion en peptide, pouvant mener à un résultat faussement positif et/ou une assignation du produit chimique d'essai à une classe de réactivité supérieure (voir paragraphes 23 et 24).

5. Comme indiqué, la méthode DPRA aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA ou une approche définie, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (6) (11) (12). Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats du DPRA pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Le DPRA est une méthode *in chemico* qui quantifie la concentration résiduelle de peptide contenant de la cystéine ou de la lysine après 24 heures d'incubation avec le produit chimique d'essai à 22,5-30°C. Les peptides de synthèse contiennent de la phénylalanine destinée à faciliter la détection. La concentration peptidique relative est mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec élution par gradient et détection UV à 220 nm. Les pourcentages de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite établis par calcul et utilisés dans un modèle prédictif (voir paragraphe 23) qui permet d'assigner le produit chimique d'essai à l'une des quatre classes de réactivité utilisées pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

7. Avant d'utiliser en routine la méthode décrite dans le présent Appendice de la Ligne directrice, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'Annexe 2.

## MODE OPÉRAIRE

8. La présente méthode d'essai est basée sur le protocole DPRA DB-ALM n° 154 (7), qui est celui utilisé pour l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM. Il est recommandé d'utiliser ce protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de la méthode au laboratoire. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires du DPRA. Dans le cas où un autre système CLHP était utilisé, l'équivalence de ce système par rapport à celui validé dans le protocole DPRA DB-ALM devra être démontrée (p.ex. en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'Annexe 2).

### Préparation des peptides contenant de la cystéine ou de la lysine

9. Des solutions mères de cystéine (Ac-RFAACAA-COOH) et de lysine (Ac-RFAAKAA-COOH) contenant des peptides de synthèse de pureté supérieure à 85 %, et de préférence supérieur à 90%, doivent être fraîchement préparées avant d'être incubées avec le produit chimique d'essai. La concentration finale du peptide à cystéine doit être de 0.667 mM dans un tampon phosphate de pH 7.5, la concentration finale du peptide à lysine de 0.667 mM dans un tampon acétate d'ammonium de pH 10.2. Les séquences d'analyse CLHP doivent être programmées avec pour objectif que le temps de l'analyse CLHP ne dépasse pas 30 heures. Dans le cas du système CLHP utilisé lors de l'étude de validation et décrit dans la présente méthode d'essai, jusqu'à 26 échantillons (comprenant le produit chimique d'essai, le témoin positif et un nombre approprié de solvants témoins, selon le nombre de solvants utilisés dans l'essai, chaque échantillon étant testé en triplicat) peuvent être analysés dans le même passage dans le système CLHP. Tous les réplicats analysés en un même passage doivent utiliser les mêmes solutions mères de peptide à cystéine et à lysine. Il est recommandé d'avoir la preuve de la solubilité des lots individuels de peptides avant leur utilisation.

### Préparation du produit chimique d'essai

10. La solubilité du produit chimique d'essai dans un solvant approprié sera évaluée avant la conduite de l'essai, conformément au mode opératoire décrit dans le protocole DPRA DB-ALM pour la solubilisation (7). Un solvant approprié est un solvant qui dissout complètement le produit chimique d'essai. Dans le DPRA, le produit chimique d'essai est incubé en large excès avec les peptides à cystéine ou à lysine ; une inspection visuelle de la solution formée est donc considérée comme suffisante pour vérifier que le produit chimique d'essai (et tous ses composants, dans le cas d'essais portant sur une substance multi-constituants ou un mélange) est bien dissous. Les solvants appropriés sont l'acétonitrile, l'eau, un mélange 1:1 eau:acétonitrile, l'isopropanol, l'acétone ou un mélange 1:1 acétone:acétonitrile. D'autres solvants peuvent être utilisés à condition qu'ils n'aient pas d'incidence sur la stabilité du peptide, d'après les essais réalisés sur des témoins de référence C (échantillons constitués du peptide seul dissous dans le solvant approprié ; voir annexe 2). Si le produit chimique d'essai n'est soluble dans aucun des solvants mentionnés plus haut, le DMSO peut être utilisé en dernier recours et quantités minimales. Il est important de noter que le DMSO peut conduire à la dimérisation du peptide et ainsi il sera beaucoup plus difficile de répondre aux critères d'acceptation. Si le DMSO est choisi, on tentera de solubiliser le produit chimique d'essai dans 300 µL de

DMSO et de diluer la solution ainsi obtenue avec 2 700 µL d'acétonitrile. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans ce mélange, on tentera de solubiliser la même quantité de produit chimique d'essai dans 1 500 µL de DMSO et de diluer la solution obtenue avec 1 500 µL d'acétonitrile. Le produit chimique d'essai doit être pré-pesé dans des flacons en verre, et dissous immédiatement avant l'essai dans un solvant approprié pour préparer une solution à 100 mM.

11. Cette approche par poids moléculaire s'applique si le produit chimique est une substance mono-constituant avec un poids moléculaire connu ou un mélange ou une substance multiconstituants de composition connue. Pour les mélanges et les substances multi-constituants de composition connue, une valeur unique agrégée de pureté doit être déterminée par la somme des proportions de ses constituants (excluant l'eau) et une valeur unique agrégée du poids moléculaire devra être déterminée en considérant les poids moléculaires de chaque constituant dans le mélange (excluant l'eau) et leurs proportions individuelles. La pureté et la masse moléculaire agrégée obtenues sont alors utilisées pour calculer le poids de produit chimique d'essai nécessaire pour préparer une solution à 100 mM. Dans le cas des polymères pour lesquels il n'est pas possible d'établir une masse moléculaire prédominante, la masse moléculaire du monomère (ou la masse moléculaire apparente des divers monomères constituant le polymère) pourra être prise en compte pour préparer une solution à 100 mM.

12. Pour des mélanges et des substances multi-constituants de composition inconnue (c.à.d. substances UVCB de composition inconnue et variable, des produits de réactions complexes ou des matériaux d'origine biologique), la solution d'essai peut être préparée au moyen de la méthode gravimétrique à une concentration de 20 mg/mL sur la base du poids des composés dans leur totalité (en excluant le solvant) dans un solvant approprié. Cette valeur se base sur un poids moléculaire par défaut de 200 g/mol. Si le mélange à tester est connu pour contenir une classe de produit chimique de poids moléculaire significativement plus élevé, le poids moléculaire par défaut et la concentration de la solution d'essai devront être ajustés en conséquence (voir p.ex. l'approche pour les formulations agrochimiques (13)). Par ailleurs, l'approche gravimétrique ne peut s'appliquer qu'en dernier recours si aucun poids moléculaire n'est identifié et qu'aucun poids moléculaire agrégé ne peut être déterminé.

### Préparation du témoin positif, des témoins de référence et des témoins de co-élution

13. L'aldéhyde cinnamique (n° CAS 104-55-2 ; pureté grade alimentaire  $\geq 95$  %) est utilisé comme témoin positif (TP) à une concentration de 100 mM dans l'acétonitrile. D'autres témoins positifs adaptés, donnant des valeurs de déplétion situées dans une fourchette moyenne, peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptabilité comparables pour la séquence. En outre, des témoins de référence (échantillons contenant uniquement le peptide dissous dans le solvant approprié) doivent aussi être inclus dans la séquence d'analyse CLHP ; ils permettent de s'assurer avant l'analyse que le système CLHP est adapté à l'usage prévu (témoins de référence A), de vérifier la stabilité des témoins de référence dans le temps (témoin de référence B) et de vérifier que le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai n'a pas d'incidence sur le pourcentage de déplétion des peptides (témoin de référence C) (voir Annexe 3). Un témoin de référence approprié est utilisé pour chaque substance afin de calculer le pourcentage de déplétion des peptides lié à cette substance (voir paragraphe 20). De plus, pour chaque produit chimique analysé, un témoin de co-élution constitué du seul produit chimique sera inclus dans la séquence afin de détecter une éventuelle co-élution du produit chimique d'essai avec le peptide à lysine ou à cystéine.

## Incubation du produit chimique d'essai avec les solutions de peptide à cystéine et à lysine

14. Les solutions de peptide à cystéine et à lysine sont mises en incubation avec le produit chimique d'essai dans des flacons en verre pour auto-échantillonneur, dans des proportions de 1:10 et 1:50 respectivement. Si un précipité est observé dès l'ajout de la solution de produit chimique d'essai à la solution de peptide, du fait d'une faible hydrosolubilité du produit chimique d'essai, on ne peut savoir avec certitude quelle est la quantité de produit chimique d'essai restant dans la solution et susceptible de réagir avec le peptide. Dans ce cas, un résultat positif pourra être utilisé, mais un résultat négatif présentera une incertitude et devra être interprété avec prudence (voir également les provisions citées au paragraphe 10 dans le cadre d'essai avec des produits chimiques non solubles à une concentration finale de 100 mM). La solution de réaction doit être maintenue dans l'obscurité à 22,5-30°C pendant 24±2 heures avant l'analyse CLHP. Chaque produit chimique d'essai doit être analysé en triplicat pour les deux peptides. Une inspection visuelle des échantillons est nécessaire avant l'analyse CLHP. Si un précipité ou une séparation de phases sont observés, il est prudent de centrifuger les échantillons à vitesse modérée (100-400xg) afin d'entraîner le précipité au fond du flacon, un excès de précipité risquant de colmater les tubes ou les colonnes du chromatographe. Dans le cas où une précipitation ou une séparation de phases sont observées à la fin de la période d'incubation, la déplétion des peptides peut être sous-estimée et un résultat négatif ne permettra pas de conclure avec une certitude suffisante à l'absence de réactivité.

## Préparation de la courbe d'étalonnage CLHP

15. Une courbe d'étalonnage doit être établie pour le peptide à cystéine et le peptide à lysine. Les étalons de peptides sont préparés dans une solution à 20% ou 25% acétonitrile:tampon, avec un tampon phosphate (pH 7.5) pour le peptide à cystéine et un tampon acétate d'ammonium (pH 10.2) pour le peptide à lysine. À partir d'étalons obtenus par dilution en série de la solution mère de peptide (0.667 mM), 6 solutions d'étalonnage sont préparées entre 0.534 et 0.0167 mM. Un blanc constitué du tampon de dilution doit être inclus dans la courbe d'étalonnage. Une courbe d'étalonnage adaptée aura un coefficient  $r^2 > 0.99$ .

## Préparation et analyse CLHP

16. Il convient de vérifier avant la conduite de l'analyse si le système est adapté à l'usage prévu. La déplétion de peptides est mesurée par CLHP couplée à un détecteur UV (détecteur à barrette de photodiodes ou détecteur à absorbance UV de longueur d'onde fixe égale à 220 nm). La colonne appropriée est installée dans le système CLHP. L'installation CLHP décrite dans le protocole validé utilise de préférence une colonne Zorbax SB-C-18 2.1 mm x 100 mm x 3.5 microns. Avec cette colonne CLHP à phase inverse, l'ensemble du système doit être équilibré à 30°C avec 50% de phase A (0.1% (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'eau) et 50% de phase B (0.085% (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile) pendant 2 heures au moins avant la conduite de l'analyse. L'analyse CLHP doit être réalisée à un débit de 0.35 mL/min pour un gradient linéaire allant de 10% à 25% d'acétonitrile pendant 10 minutes, suivi d'une augmentation rapide jusqu'à 90% d'acétonitrile pour éliminer les autres matériaux. Des volumes égaux de chaque étalon, échantillon et témoin doivent être injectés. La colonne doit être ré-équilibrée aux conditions initiales pendant 7 minutes entre les injections. Si une colonne CLHP à phase inverse d'un modèle différent est utilisée, il peut être nécessaire d'ajuster les paramètres ci-dessus pour assurer une élution et une intégration appropriées des peptides à cystéine et à lysine, en particulier le volume injecté, qui peut varier selon le système utilisé (habituellement

entre 3 et 10 µL). Il est essentiel, si des paramètres CLHP différents sont utilisés, de démontrer qu'ils sont équivalents au paramétrage validé décrit ci-dessus (par des essais sur les substances d'épreuve de compétence de l'Annexe 3, par exemple). L'absorbance est mesurée à 220 nm. Si un détecteur à barrette de photodiodes est utilisé, l'absorbance à 258 nm doit également être relevée. On notera que certains lots d'acétonitrile peuvent avoir une incidence négative sur la stabilité des peptides, qui doit être évaluée lorsqu'un nouveau lot d'acétonitrile est utilisé. Le rapport entre la surface du pic à 220 nm et la surface du pic à 258 nm peut servir d'indicateur de co-élution. Pour chaque échantillon, un rapport compris entre 90 et 100 % du carré de la moyenne des rapports des surfaces obtenue pour les échantillons témoins constitue un bon indicateur de l'absence de co-élution.

17. Certains produits chimiques d'essai peuvent promouvoir l'oxydation du peptide à cystéine. Le pic du peptide à cystéine dimérisé peut être observé visuellement. S'il apparaît qu'une dimérisation s'est produite, il convient de le noter, car le pourcentage de déplétion du peptide peut être surestimé, amenant à une prédiction faussement positive et/ou une assignation à une classe de réactivité supérieure (voir paragraphes 23 et 24).

18. L'analyse CLHP des peptides à cystéine et des peptides à lysine doit être programmée dans le temps de telle sorte que l'injection du premier échantillon commence 22 à 26 heures après le mélange du produit chimique d'essai avec la solution de peptide. Les séquences d'analyse CLHP doivent être programmées dans le souci de maintenir le temps d'analyse en-deçà de 30 heures. Dans le cas du système CLHP utilisé dans l'étude de validation et décrit dans la présente méthode d'essai, un maximum de 26 échantillons peuvent être analysés lors d'un même passage dans le système CLHP (voir aussi paragraphe 9). On trouvera à l'Annexe 3 un exemple de séquence d'analyse CLHP.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Évaluation des données

19. On établit de manière photométrique à 220 nm pour chaque échantillon, la concentration de peptide à lysine ou à cystéine, en mesurant la surface des pics appropriés par intégration des pics (tout ce qui se situe sous la courbe) et en calculant la concentration peptidique d'après la courbe d'étalonnage linéaire établie à partir des étalons.

20. On établit pour chaque échantillon le pourcentage de déplétion des peptides en mesurant la surface des pics et en la divisant par la surface moyenne des pics des témoins de référence C correspondants (voir Annexe 3) selon la formule ci-après.

$$\text{Pourcentage de déplétion des peptides} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Surface du pic peptidique pour le réplikat}}{\text{Surface moyenne des pics peptidiques des témoins de référence C}} \right) \right] \times 100$$

### Critères d'acceptabilité

21. Les critères suivants doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide :

- a) la courbe d'étalonnage doit avoir un coefficient  $r^2 > 0.99$  ;
- b) le pourcentage moyen de déplétion des peptides des trois réplicats pour le témoin positif à l'aldéhyde cinnamique doit se situer entre 60.8 % et 100 % pour le peptide à cystéine et entre 40.2 % et 69 % pour le peptide à lysine (si d'autres témoins positifs sont utilisés, une gamme de référence sera établie), et l'écart type maximal pour les réplicats du témoin positif doit être  $< 14.9$  % pour le taux de déplétion de la cystéine et  $< 11.6$  % pour le taux de déplétion de la lysine ;
- c) la concentration peptidique moyenne des témoins de référence A doit être de  $0.50 \pm 0.05$  mM et le coefficient de variation (CV) des surfaces des pics peptidiques doit être  $< 15.0$  % pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile.

Si un seul ou plusieurs de ces critères ne sont pas remplis, l'essai doit être répété.

22. Les critères suivants doivent être remplis pour que les résultats relatifs à un produit chimique d'essai soient considérés comme valides :

- a) l'écart type maximal pour les réplicats du produit chimique d'essai doit être  $< 14.9$  % pour le taux de déplétion de la cystéine et  $< 11.6$  % pour le taux de déplétion de la lysine,
- b) la concentration peptidique moyenne des trois témoins de référence C dans le solvant approprié doit être de  $0.50 \pm 0.05$  mM.

Si ces critères ne sont pas remplis, les données doivent être rejetées et l'essai doit être répété pour le produit chimique d'essai considéré.

### Modèle prédictif

23. Le pourcentage moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine est calculé pour chaque produit chimique d'essai. Une déplétion négative est considérée comme égale à 0 pour le calcul de la moyenne. Si l'on utilise le modèle prédictif cystéine 1:10/lysine 1:50 du tableau 1, c'est le seuil de 6.38 % de déplétion peptidique moyenne qui sera pris en compte pour l'identification des sensibilisants et des non-sensibilisants cutanés dans le cadre d'une approche IATA ou d'une approche définie. L'application du modèle prédictif pour assigner un produit chimique d'essai à une classe de réactivité (réactivité faible, modérée ou forte) permettra peut-être d'obtenir des informations utiles pour évaluer la puissance de sensibilisation de ce produit chimique dans le cadre d'une approche de type IATA ou d'une approche définie.

**Tableau 1. Modèle prédictif1 cystéine 1:10/ lysine 1:50**

Pourcentage moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine	Classe de réactivité	Prédiction DPRA <sup>2</sup>
$0 \% \leq \% \text{ moyen de déplétion} \leq 6.38 \%$	Réactivité nulle ou minimale	Négative
$6.38 \% < \% \text{ moyen de déplétion} \leq 22.62 \%$	Faible réactivité	Positive
$22.62 \% < \% \text{ moyen de déplétion} \leq 42.47 \%$	Réactivité modérée	
$42.47 \% < \% \text{ moyen de déplétion} \leq 100 \%$	Forte réactivité	

Note : 1 Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure (2).

2 Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA ou AD et conformément aux dispositions des paragraphes 2 et 4.

24. Il peut arriver que le produit chimique d'essai (la substance, ou l'un ou plusieurs des composants d'une substance multi-constituants ou d'un mélange) donne lieu à une absorption significative à 220 nm et ait le même temps de rétention que le peptide (co-élution). La co-élution peut être résolue par un léger ajustement du système d'analyse CLHP afin de mieux séparer les temps de rétention entre le produit chimique d'essai et le peptide. Si un autre système d'analyse CLHP est employé dans l'objectif de résoudre cette problématique de co-élution, son équivalence au système CLHP validé dans la présente ligne directrice devra être démontrée (p.ex. au moyen des substances d'épreuve de compétence citées à l'Annexe 2) Dans les cas de co-élution, le pic du peptide ne peut pas être intégré, et il n'est pas possible de calculer le pourcentage de déplétion des peptides. Si la co-élution pour ce produit chimique d'essai concerne à la fois les peptides à cystéine et à lysine, ou seulement le peptide à cystéine, l'analyse est considérée comme « non concluante ». Si la co-élution n'intervient que pour le peptide à lysine, le modèle prédictif du tableau 2 pour la cystéine 1:10 est applicable.

Tableau 2. Modèle prédictif1 cystéine 1:10

Pourcentage de déplétion de la cystéine (Cys)	Classe de réactivité	Prédiction DPRA <sup>2</sup>
0 % ≤ % déplétion Cys ≤ 13.89 %	Réactivité nulle ou minimale	Négative
13.89 % < % déplétion Cys ≤ 23.09 %	Faible réactivité	Positive
23.09 % < % déplétion Cys ≤ 98.24 %	Réactivité modérée	
98.24 % < % déplétion Cys ≤ 100 %	Forte réactivité	

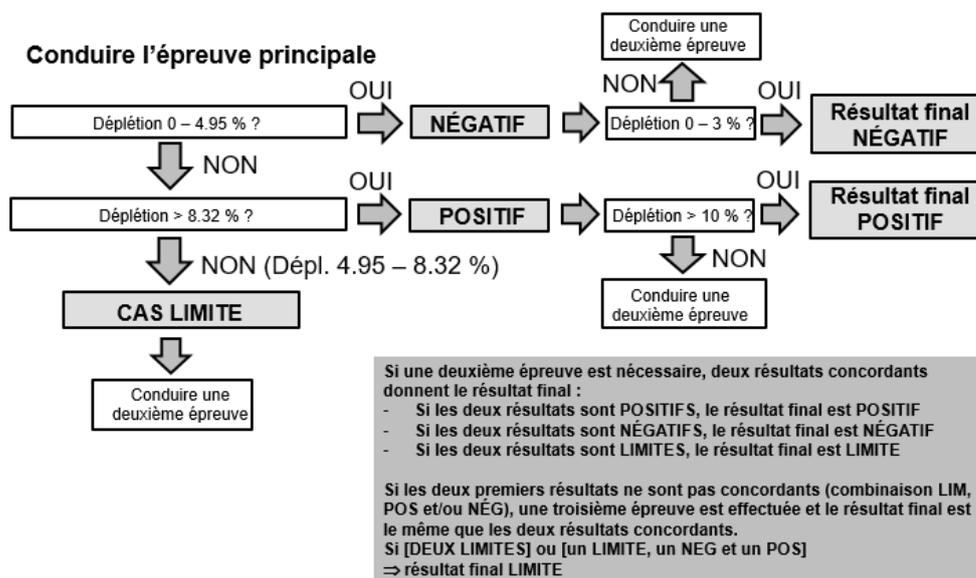
Note : 1 Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.

2 Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 2 et 4.

25. Il peut également y avoir des cas où les temps de rétention du produit chimique d'essai et de l'un des peptides ne se recouvrent pas complètement. Les pourcentages de déplétion peuvent alors être estimés et utilisés dans le modèle prédictif cystéine 1:10/lysine 1:50, sans qu'il soit possible de classer avec précision le produit chimique d'essai dans l'une des classes de réactivité. Le logigramme de la Graphique 1 est utilisé pour décider de répéter une épreuve et pour évaluer les plages de valeurs limites.

26. Pour un produit chimique d'essai, une seule analyse CLHP pour le peptide à cystéine et le peptide à lysine devrait suffire si le résultat est sans équivoque. Cependant, lorsque les données disponibles sont proches du seuil utilisé pour distinguer un résultat positif d'un résultat négatif (c'est-à-dire taux de déplétion moyen dans l'intervalle 3 % à 10% pour le modèle de prédiction cystéine 1:10/lysine 1:50, ou taux de déplétion moyen de la cystéine dans l'intervalle 9 % à 17 % pour le modèle de prédiction cystéine 1:10), des tests complémentaires sont recommandés. En particulier, en cas de résultats négatifs dans ces intervalles (3 % à 6.38% pour le modèle de prédiction cystéine 1:10/lysine 1:50, 9 % à 13.89 % pour le modèle de prédiction cystéine 1:10), une deuxième analyse sera menée, ainsi qu'une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

Figure 1. Logigramme du modèle prédictif du DPRA (déplétion moyenne), prenant en compte les plages de valeurs limites (PVL) et on répète certaines épreuves le cas échéant pour conclure quant aux résultats limites.



Le seuil original pour une classification positive est de 6.38%, et la plage de valeur limite dérivée statistiquement significative autour de ce seuil s'étend de 4.95% à 8.32%. Le même logigramme s'applique pour le modèle prédictif de la cystéine seule : 9% au lieu de 3%, >17% au lieu de >10%, 10.56% au lieu de 4.95% et >18.47% au lieu de >8.32%.

## Rapport d'essai

27. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

### Produit chimique d'essai et témoins (témoin positif et solvant/véhicule)

- Substance mono-constituant (produit chimique d'essai et témoins):
  - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
  - Propriétés physico-chimiques, telles que état physique, apparence, hydrosolubilité, 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.

- 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 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 ;
  - 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.
- Informations complémentaires pour le témoin positif
  - Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Informations complémentaires pour le solvant/véhicule
  - Solvant/véhicule utilisé et teneur de chacun de ses constituants, s'il y a lieu ;
  - Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai ;
  - Pour l'acétonitrile, résultats du test d'impact sur la stabilité des peptides.

### ***Peptides***

- Fournisseur, lot, pureté

### ***Paramètres et analyse CLHP***

- Type de système CLHP, colonne CLHP et colonne de garde, détecteur, auto-échantillonneur ;
- Paramètres pertinents pour l'analyse CLHP, tels que la température de la colonne, les volumes injectés, le débit et le gradient.

### ***Adéquation du système***

- Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat d'étalon et de témoin de référence A ;
- Représentation graphique des courbes d'étalonnage linéaires et indication de leur coefficient  $r^2$  ;
- Concentration peptidique de chaque réplicat du témoin de référence A ;
- Concentration peptidique moyenne (mM) des trois témoins de référence A, écart type et coefficient de variation ;
- Concentration peptidique des témoins de référence A et C.

### ***Séquence d'analyse***

- Pour les témoins de référence :
  - Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat B et C ;

- Aire moyenne des pics peptidiques à 220 nm pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile, écart type et coefficient de variation (vérification de la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse) ;
- Pour chaque solvant utilisé, aire moyenne des pics peptidiques à 220 nm pour les trois témoins de référence C appropriés (pour le calcul du pourcentage de déplétion des peptides) ;
- Pour chaque solvant utilisé, concentration peptidique (mM) pour les trois témoins de référence C appropriés ;
- Pour chaque solvant utilisé, concentration peptidique moyenne (mM) pour les trois témoins de référence C appropriés, écart type et coefficient de variation.
- Pour le témoin positif :
  - Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat ;
  - Pourcentage de déplétion des peptides pour chaque réplicat ;
  - Taux moyen de déplétion des peptides pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation.
- Pour chaque produit chimique d'essai :
  - Apparence du précipité dans le mélange de réaction à la fin du temps d'incubation, s'il y a lieu. Indiquer si le précipité a été re-solubilisé ou centrifugé ;
  - Présence d'une co-élution ;
  - Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu ;
  - Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat ;
  - Pourcentage de déplétion des peptides pour chaque réplicat ;
  - Pourcentage moyen de déplétion des peptides pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation ;
  - Pourcentages moyens de déplétion pour la cystéine et pour la lysine ;
  - Modèle prédictif utilisé et prédiction DPRA.

### ***Épreuves de compétence***

- Attestation selon laquelle l'établissement responsable du test a démontré sa compétence dans l'utilisation de la méthode d'essai en testant les substances d'épreuve de compétence, avant une application de la méthode d'essai en routine.

### ***Discussion des résultats***

- Description de toutes modifications non prévues apportées au mode opératoire ;
- Discussion des résultats obtenus par la méthode d'essai DPRA en précisant s'ils se situent dans les plages de valeurs spécifiées au paragraphe 26.

### ***Conclusions***

## Référence de l'appendice I

- (1) Gerberick et al. (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.
- (2) Gerberick *et al.* (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra).
- (4) EC EURL ECVAM (2012), Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra)
- (5) Natsch *et al.* (2013), A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (6) Jaworska *et al.* (2013), Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice *Journal of Applied Toxicology*, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
- (7) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (8) ECETOC (2003), Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (9) Urbisch et al. (2016), Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization, *Chem Res Toxicol.* 29(5):901-13 doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00055
- (10) Pattlewicz et al. (2016), Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol.*; 82:147-155. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.08.007
- (11) Jaworska et al. (2015), *Arch Toxicol.* 2015 Dec;89(12):2355-83. doi: 10.1007/s00204-015-1634-2)

- (12) 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/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
- (13) Strickland J, Truax J, Corvaro M, Settivari R, Henriquez J, McFadden J, Gullede T, Johnson V, Gehen S, Germolec D, Allen DG, Kleinstreuer N. Application of Defined Approaches for Skin Sensitization to Agrochemical Products. *Front Toxicol.* 2022 May 2;4:852856. doi: 10.3389/ftox.2022.852856. PMID: 35586187; PMCID: PMC9108145.

APPENDICE I, ANNEXE 1

Limites connues de l'essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA)

Le tableau suivant résume les limites connues de DPRA

Classe de substances / interférence	Cause de sous-estimation ou d'interférence potentielle	Interprétation des données	Exemple de substance
Métaux et composés inorganiques	Connus pour réagir avec les protéines via des mécanismes autres que la liaison covalente	L'essai n'est pas applicable	Sulfate de nickel ; 7786-81-4
Pro-haptènes	Produits chimiques d'essai dont il est démontré qu'ils requièrent strictement une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée. Ils ne sont pas détectés par la méthode d'essai sauf si l'activation est causée par auto-oxydation à un degré similaire à celui qui se produit in vivo/chez l'homme. Néanmoins, on ne saura pas en général si c'est le cas ou pas.	Peut conduire à des faux négatifs. Les résultats négatifs obtenus par la méthode d'essai devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et en lien avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA ou d'une approche définie.	Diéthylènetriamine; 111-40-0 (human 1A, LLNA n/a)
Pré-haptènes	Les produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) apparaissent le plus souvent correctement identifiés par la méthode d'essai		Linalool: 78-70-6
Produits chimiques absorbant de manière significative à 220 nm et ayant le même temps de rétention que le peptide (co-élution)	Dans les cas de co-élution, le pic du peptide ne peut pas être intégré, et il n'est pas possible de calculer le pourcentage de déplétion des peptides.	Si la co-élution pour ce produit chimique d'essai concerne à la fois les peptides à cystéine et à lysine, ou seulement le peptide à cystéine, l'analyse est considérée comme « non concluante » et il faudra considérer un ajustement du système d'analyse CLHP (voir paragraphe 22). Si la co-élution n'intervient que pour le peptide à lysine, le modèle prédictif du tableau 2 pour la cystéine 1:10 est applicable.	Acide salicylique: 69-72-7
Mélanges complexes de composition inconnue, substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques	L'approche par poids moléculaire n'est pas applicable – Voir paragraphe 12 pour les conditions d'application de l'approche gravimétrique.	Voir paragraphe 12.	Substances UVCB, émissions chimiques, produits ou mélanges de composition variable ou incomplètement connue
Produits chimiques d'essai qui ne peuvent être dissouts dans un solvant approprié à une	Il n'est pas certain qu'une exposition suffisante soit atteinte	Les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent être testés à des concentrations plus basses auxquelles ils sont solubles. Dans ce cas, un résultat positif pourra	n.d.

concentration finale de 100 mM		quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif.	
Produits chimiques qui précipitent dans la solution de réaction	Il n'est pas certain qu'une exposition suffisante soit atteinte	Aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne pourra être tirée avec confiance d'un résultat négatif	Myristate d'isopropyl CAS: 110-27-0
Produits chimiques qui ne se lient pas de façon covalente au peptide mais qui facilitent son oxydation (p.ex. dimerisation de la cystéine)	Peuvent amener à une surestimation potentielle de la déplétion en peptide, pouvant mener à un résultat faussement positif		DMSO Oxydant
Produits chimiques qui sont solubles uniquement dans le DMSO	Le DMSO conduit à une dimérisation excessive du peptide ce qui entraîne un bruit de fond de déplétion en cystéine élevé	Peut conduire à des faux négatifs.	n.d.

## APPENDICE I, ANNEXE 2

## SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in chemico* : Essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA)

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leur compétence technique en obtenant les prédictions attendues par la méthode DPRA pour les 10 substances d'épreuve de compétence recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de déplétion de la cystéine et de la lysine 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, la qualité élevée des données de référence *in vivo* disponibles et des données *in vitro* obtenues par le DPRA, ainsi que l'utilisation de ces substances dans l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM pour démontrer que la méthode d'essai a été mise en œuvre avec succès dans les laboratoires participant à l'étude.

**Tableau 3. Substances d'épreuve recommandées pour démontrer la compétence technique des laboratoires relative à l'essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA)**

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> <sup>1</sup>	Prédiction DPRA <sup>2</sup>	Intervalle de variation <sup>3</sup> du % de déplétion du peptide à cystéine	Intervalle de variation <sup>3</sup> du % de déplétion du peptide à lysine
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	60-80	10-55
Formaldéhyde	50-00-0	Liquide	Sensibilisant (fort)	Positive	30-60	<24
Benzylidène-acétone	122-57-6	Solide	Sensibilisant (modéré)	Positive	80-100	<7
Farnesal	19317-11-4	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	15-55	<25
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	<7	<5.5
6-Méthylcoumarine	92-48-8	Solide	Non-sensibilisant	Négative	<7	<5.5
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	<7	<5.5
4-Méthoxyacétophénone	100-06-1	Solide	Non-sensibilisant	Négative	<7	<5.5

Note : 1 La prédiction in vivo des dangers (et de la puissance sensibilisante) est fondée sur les données ELGL (5). La puissance in vivo est déterminée à partir de critères proposés par ECETOC (8).

2 Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 2 et 4.

3 Intervalles déterminés sur la base d'au moins 10 valeurs de déplétion établies par 6 laboratoires indépendants.

APPENDICE I, ANNEXE 2

EXEMPLE DE SÉQUENCE D'ANALYSE

<b>Étalons et témoins de référence</b>	Étalon 1 Étalon 2 Étalon 3 Étalon 4 Étalon 5 Étalon 6 Tampon de dilution Témoin de référence A, rép. 1 Témoin de référence A, rép. 2 Témoin de référence A, rép. 3
<b>Témoins de co-élution</b>	Témoin de co-élution pour le produit chimique d'essai 1 Témoin de co-élution 2 pour le produit chimique d'essai 2 ....
<b>Témoins de référence</b>	Témoin de référence B, rép. 1 Témoin de référence B, rép. 2 Témoin de référence B, rép. 3
<b>Première série de répliqués</b>	Témoin de référence C, rép. 1 Aldéhyde cinnamique, rép. 1 Échantillon 1, rép. 1 Échantillon 2, rép. 1 ....
<b>Deuxième série de répliqués</b>	Témoin de référence C, rép. 2 Aldéhyde cinnamique, rép. 2 Échantillon 1, rép. 2 Échantillon 2, rép. 2 ....
<b>Troisième série de répliqués</b>	Témoin de référence C, rép. 3 Aldéhyde cinnamique, rép. 3 Échantillon 1, rép. 3 Échantillon 2, rép. 3 ....
<b>Témoins de référence</b>	Témoin de référence B, rép. 4 Témoin de référence B, rép. 5 Témoin de référence B, rép. 6

Trois séries de témoins de référence (échantillons constitués seulement de peptide dissous dans le solvant approprié) doivent être incluses dans la séquence d'analyse :

Témoin de référence A : utilisé pour vérifier l'adéquation du système CLHP.

Témoin de référence B : inclus au début et à la fin de la séquence d'analyse pour vérifier la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse.

Témoin de référence C : inclus dans la séquence d'analyse pour vérifier que le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai n'a pas d'incidence sur le pourcentage de déplétion des peptides.

## APPENDICE II

**Sensibilisation cutanée *in chemico* : essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés  
(Amino acid Derivative Reactivity Assay, ADRA)****REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES**

1. La méthode d'essai ADRA est proposée pour l'étude de l'événement moléculaire initiateur dans l'AOP sensibilisation cutanée – à savoir la réactivité aux protéines – par quantification de la réactivité des produits chimiques testés vis-à-vis de dérivés modèles d'acides aminés de synthèse contenant soit de la lysine, soit de la cystéine (1) (2) (3). Les niveaux de déplétion des dérivés de cystéine N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cystéine (CAS. 32668-00-1), qui est connue sous l'acronyme NAC, et des dérivés de lysine  $\alpha$ -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (CAS. 397841-92-8), connue sous l'acronyme NAL, sont ensuite utilisés afin d'aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés (1) (2) (3).
2. La reproductibilité et la transférabilité de la méthode d'essai ADRA ont été démontrées lors d'études de validation coordonnées par le Centre japonais de validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (4)(5)(5)(7)(8)(9)(10). Il y a deux sortes de détection du ADRA : la détection ultraviolet (UV) et la détection par fluorescence (FL) (11)(12). La reproductibilité intra-laboratoire et la reproductibilité inter-laboratoires du ADRA étaient de 100% chacune, à la fois pour la détection UV et la détection FL (9)(10). La prédiction du potentiel de sensibilisation cutanée basée sur l'essai local des ganglions lymphatiques (ELGL) a montré que l'ADRA à détection UV identifie les sensibilisants et non-sensibilisants avec une précision de 76% (9104/136), une sensibilité de 76% (74/98), une spécificité de 79% (30/38) et une précision pondérée de 77% (98). De plus, la prédiction d'une sensibilisation cutanée chez l'homme indique que l'ADRA à détection UV a une précision de 84% (67/80), une sensibilité de 83% (48/58), une spécificité de 86% (19/22) et une précision pondérée de 84% (8). Cependant, les degrés de précision indiqués ici pour le test ADRA utilisé seul ne sont mentionnés qu'à titre de référence, car il est recommandé de combiner cette méthode d'essai à d'autres sources d'information, dans le cadre d'une démarche IATA, conformément aux dispositions énoncées au paragraphe 7 et 8 de l'Introduction générale. Au demeurant, 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. Sur la base de l'ensemble des données disponibles, il a été établi que le domaine d'applicabilité du test ADRA couvre divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes réactionnels, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (1) (2) (3)(4). Selon une revue indépendante par des pairs, les études de validation du test ADRA a démontré l'acceptabilité de cette méthode dans le cadre d'une stratégie d'essai intégrée visant à l'identification prédictive du danger de sensibilisation cutanée (6) (13) (14).
3. La coélution se produit lorsque le produit chimique testé (une substance individuelle, ou un ou plusieurs des constituants d'une substance multi-constituants ou un mélange) a été détecté de manière significative à une DO de 281nm (détecteur à UV) ou Ex /Em 284/333 nm (détecteur à FL) a a le même

temps de rétention que NAC ou NAL (15). La co-élution des composés absorbants dans la lumière UV au moyen de nucléophile NAC et NAL peut mener à des résultats non concluants quand on utilise une lumière UV conventionnelle (11)(12). Ce problème peut être remédié en effectuant une mesure parallèle ou alternative au moyen d'un détecteur à FL ; ainsi les valeurs de déplétion obtenues simultanément au moyen des deux détecteurs ont été collectées lors des études de validation (9)(10) et des résultats équivalents à ceux obtenus avec le détecteur à UV ont été générés, indiquant que les deux méthodes de détection sont valides, mais que la méthode FL peut diminuer le nombre de résultats non concluants. Les limitations connues de la méthode d'essai ADRA sont tabulées à l'Appendice II, Annexe 1.

4. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé<sup>1</sup>. Cette méthode d'essai n'est pas applicable aux composés métalliques, connus pour réagir avec les protéines par des mécanismes autres que les liaisons covalentes. La méthode d'essai décrite dans le présent appendice de la Ligne directrice est une méthode *in chemico*, qui ne fait pas intervenir de système métabolique. Elle ne permet pas d'identifier les produits chimiques requérant une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée (pro-haptènes). Dans certains cas, les produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) apparaissent comme correctement identifiés par la méthode d'essai (1)(2)(3)(4)(7)(8). A la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs obtenus par la méthode d'essai devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et en lien avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. Les produits chimiques favorisant l'oxydation du réactif NAC (*N*-(2-(1-naphtyl)acétyl)-L-cystéine), c'est-à-dire la dimérisation de la cystéine, peuvent induire une surestimation de la déplétion de NAC, pouvant mener à un résultat faussement positif (voir paragraphes 22 et l'Appendice II, Annexe 1) ; la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) utilisant un détecteur à UV devrait permettre de détecter et quantifier tout dimère de NAC formé, et ainsi de confirmer ou d'exclure une déplétion liée à une dimérisation oxydative et non à une réaction et une liaison covalente avec la ou les substance(s) d'essai.

5. La méthode d'essai ADRA est applicable aux produits chimiques peu solubles (16). Pour être testés, les produits chimiques visés doivent pouvoir être dissous dans un solvant approprié à une concentration finale de 1 mM (voir paragraphe 14). Les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent être testés à des concentrations plus basses. Dans ce cas, un résultat positif pourra quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif.

6. Les réactifs nucléophiles utilisés dans l'ADRA sont quantifiés à 281 nm (1)(2). En cas de co-élution du réactif nucléophile et du produit chimique d'essai absorbants les UV, il peut en résulter une prédiction non concluante. Cependant, les substances qui absorbent les UV dans cette gamme du spectre sont généralement limitées à celles qui présentent une double liaison conjuguée, ce qui réduit notablement le potentiel de résultats non concluants dus à la co-élution des composés absorbants les UV (15). Par ailleurs, NAC et NAL sont fluorescents et par conséquent ils peuvent être détectés au moyens d'un détecteur à FL (11)(12). Puisque les produits chimiques testés ont rarement de fluorescence à la longueur d'onde spécifique de l'excitation/émission, il est possible de réduire plus encore la fréquence de résultats non concluants en

---

<sup>1</sup> et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode ADRA aux substances et/ou aux mélanges (voir un résumé des limites connues du DPRA dans l'Annexe 1 du présent Appendice

ayant recours à un détecteur à FL. En particulier dans les cas des substances multi-constituants avec une absorption des UV.

7. Lors de l'évaluation du potentiel sensibilisant d'un produit chimique au moyen de la méthode ADRA, il existe deux options pour la préparation de la solution mère (voir Figure 1 et paragraphe 15-16) : a) si le produit chimique testé est une substance mono-constituant avec un poids moléculaire connu ou un mélange ou une substance multi-constituants de composition connue, l'essai ADRA doit être effectué au moyen d'une solution mère préparée à une concentration de 4mM (8) ; b) si le produit chimique testé est une substance mutli-constituants de poids moléculaire inconnu, l'essai ADRA doit être effectué en utilisant une approche gravimétrique à partir d'une solution mère à 0.5 mg/mL. De plus, l'approche gravimétrique avec l'essai ADRA (0.5 mg/mL) peut également être utilisée pour les polymères. L'évaluation de la capacité prédictive de l'essai ADRA effectué par l'approche gravimétrique a indiqué que l'ADRA (0.5 mg/ML) identifiait les sensibilisants et les non-sensibilisant avec une précision de 76% (103/136), une sensibilité de 74% (73/98), une spécificité de 79% (30/38) et une précision pondérée de 77% comparé à l'essai ELGL (8). De plus, la capacité prédictive pour les données humaines indiquait que la méthode gravimétrique ADRA (0.5 mg/ML) a une précision de 83% (66/80), une sensibilité de 81% (47/58), une spécificité de 86% (19/22) (8). La gamme de poids moléculaire pour les produits chimiques testés utilisés dans les études de validation de l'essai ADRA (0.5 mg/mL) était de 60.10-388.29, et le ratio de réactif nucléophile /produit chimique testé dans la solution de réaction à ce moment-là était de 1 :416-1 :64 (9).

8. La méthode d'essai ADRA peut apporter une aide à l'identification des sensibilisants cutanés et des non-sensibilisants. Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer si les résultats de l'essai ADRA pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation dans le cadre d'une approche combinant d'autres sources d'information (13)(14).

## PRINCIPE DE L'ESSAI

9. La méthode d'essai ADRA est une méthode *in chemico* qui quantifie les concentrations résiduelles de NAC et NAL, après une incubation de 24±1 heures à 25±1 °C en présence du produit chimique d'essai. Ces deux dérivés comportent un cycle naphthalène introduit à leur extrémité *N*-terminale pour faciliter la détection UV et la détection FL. Les concentrations relatives de NAC et NAL sont mesurées par CLHP et détection UV à 281 nm, en option la possibilité de combiner avec la détection FL (excitation/émission [Ex /Em], 284/333 nm) et un gradient d'élution (voir paragraphe 19). Afin d'appuyer la distinction entre sensibilisants cutanés et non-sensibilisants, les taux de déplétion de NAC et NAL sont ensuite établis par calcul et utilisés dans un modèle prédictif (voir paragraphe 26).

10. Avant d'utiliser en routine la méthode décrite dans la présente méthode d'essai, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'Annexe 2 du présent Appendice II.

## MODE OPÉRATOIRE

11. Cette méthode d'essai est basée sur le protocole (17) utilisé pour l'étude de validation du test ADRA coordonnée par le JaCVAM et recommandé aux laboratoires mettant en œuvre la méthode ADRA. Les principales composantes et procédures de la méthode ADRA sont décrites ci-après. Avant d'utiliser un autre système d'analyse CLHP, on démontrera son équivalence par rapport au système validé dans le protocole, de préférence par des essais sur les substances d'épreuve de compétence de l'Annexe 2 du présent Appendice II.

### Qualité des réactifs NAC et NAL

12. Les réactifs nucléophiles peuvent être obtenus sous le nom de « ADRA Kit for Skin Sensitisation Test » auprès de FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, n° catalogue 296-80901. L'utilisation de NAC/NAL en tant que réactifs pour détecter la sensibilisation fait l'objet d'un brevet exclusivement au Japon, chez Fujifilm Corporation. Dans les autres pays, les réactifs NAC/NAL peuvent être utilisés sans autorisation. Si des réactifs NAC/NAL provenant d'autres fabricants sont utilisés, ils doivent remplir les trois critères de qualité ci-après. Pour éviter d'avoir à contrôler la qualité et pouvoir pratiquer sans délai le test ADRA, il est possible de se procurer des réactifs NAC et NAL fabriqués spécifiquement pour répondre à ces critères de qualité.

#### *Exigences de qualité pour les réactifs NAC et NAL :*

- 1) Pureté : au moins 98 % pour les deux réactifs NAC et NAL.
- 2) Stabilité : en utilisant une solution mère de NAC et NAL, préparer un témoin de référence exempt de tout produit chimique d'essai et quantifier les niveaux résiduels de NAC et NAL immédiatement après la préparation (0 heure) et après 24 heures d'incubation. Le pourcentage résiduel de NAC et NAL est calculé de la manière suivante :

$$\text{Niveaux résiduels de NAC} = \frac{\text{Surface au pic de NAC}}{\text{Total de surface au pic de NAC et dimère de NAC}} \times 100$$

$$\text{Niveaux résiduels de NAL} = \frac{\text{Surface au pic de NAC à 24 heure}}{\text{Surface au pic de NAL à heure 0}} \times 100$$

La cause principale de la dégradation de la stabilité de NAC est la dimérisation, qui peut affecter la réactivité avec le produit chimique et la reproductibilité de l'essai (3). Par conséquent, le niveau résiduel de NAC doit être calculé en fonction de la quantité totale de NAC et son dimère. Puisque les dimères peuvent se former dans le temps ou peuvent s'être formés pendant le temps de

préparation de la solution mère, le niveau résiduel de NAC est calculé au moment de la préparation de la solution mère et après 24 heures. Les niveaux résiduels de NAC (à la fois à heure 0 et après 24 heures) et de NAL (à 24 heures) doivent au minimum être de 90% dans chacun des cas (17).

3) Réactivité : la réactivité des réactifs NAC et NAL doit être évaluée sur les dix substances d'épreuve de compétence indiquées à l'Appendice II, Annexe 2 et doit être conforme aux exigences de ladite annexe.

### Préparation de la solution mère de NAC et NAL

13. La solubilité de chaque lot de NAC et NAL doit être vérifiée avant usage. La solution mère de NAC doit être préparée à la concentration de 2 mM dans 100 mM de tampon phosphate de pH 8.0, incluant 0.333  $\mu\text{M}$  d'EDTA, et la solution mère de NAL à la concentration de 2 mM dans 100 mM de tampon phosphate de pH 10.2. Ces deux solutions mères sont ensuite diluées dans du tampon pour obtenir des solutions mères à 6.667  $\mu\text{M}$ . Les solutions de NAC et NAL doivent être utilisées dès que possible après préparation (3). Si elles doivent être stockées, elles peuvent être congelées et conservées pendant douze mois au plus à une température inférieure à -75 °C avant utilisation. La concentration finale du mélange d'incubation de NAC est de 5  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate de pH 8.0, et la concentration finale de le mélange d'incubation de NAL est de 5  $\mu\text{M}$  dans du tampon phosphate de pH 10.2.

### Préparation de la solution de produit chimique d'essai

14. La solubilité du produit chimique d'essai dans un solvant approprié sera évaluée avant la conduite de l'essai conformément au mode opératoire décrit dans le protocole ADRA du JaCVAM (17). Un solvant approprié est un solvant qui dissout complètement le produit chimique d'essai. Le protocole ADRA spécifie que soit NAC soit NAL est incubé dans un volume en excès du produit chimique d'essai ; un examen visuel permettant de s'assurer que la solution de produit chimique d'essai est claire suffit donc pour confirmer que le produit chimique d'essai (et tous ses constituants, dans le cas d'une substance multi-constituants ou d'un mélange) est dissous (17). Les solvants appropriés sont l'eau distillée, l'acétonitrile et l'acétone. Si le produit chimique d'essai n'est soluble dans aucun des solvants mentionnés plus haut, le DMSO peut être utilisé en dernier recours et quantités minimales (19). Il est important de noter que le DMSO peut conduire à la dimérisation du réactif nucléophile NAC (13) et ainsi il sera beaucoup plus difficile de répondre aux critères d'acceptation. Si un solvant DMSO-acétonitrile est choisi (5 % de DMSO dans l'acétonitrile), le produit chimique d'essai doit être dissous à 20 mM dans le DMSO, et cette solution doit être diluée 20 fois avec de l'acétonitrile pour préparer une solution de produit chimique d'essai à 4 mM. Dans le cas où l'usage du DMSO provoque l'augmentation de la dimérisation du réactif NAC, cela peut être vérifié de façon analytique, dans la mesure où le dimère NAC est détectable par CLHP. Dans le cas où un solvant autre que ceux déjà considéré comme appropriés pour l'ADRA est utilisé pour le produit chimique testé, il est nécessaire de confirmer que le solvant en lui-même ne crée pas de déplétion de NAC ou NAL (par exemple dimérisation, oxydation) et ne dégrade pas ou ne perturbe pas l'intégrité de du produit chimique testé. Le produit chimique d'essai doit être pré-pesé dans un tube en polypropylène à usage unique et dissous immédiatement avant l'essai dans un solvant approprié pour préparer une solution mère à 4 mM (voir paragraphe 5).

15. Cette approche par poids moléculaire peut s'appliquer si le produit chimique est une substance mono-constituant avec un poids moléculaire connu ou un mélange ou une substance multiconstituants de composition connue (voir figure 1). Pour les mélanges et les substances multi-constituants de composition connue, une valeur unique agrégée de pureté doit être déterminée par la somme des proportions de ses constituants (excluant l'eau) et une valeur unique agrégée du poids moléculaire devra être déterminée en considérant les poids moléculaires de chaque constituant dans le mélange (excluant l'eau) et leurs proportions individuelles. La pureté résultant et le poids moléculaire agrégé devront alors être utilisés pour calculer le poids du produit chimique testé nécessaire pour préparer une solution à 4mM.

16. Les substances mono-constituant de poids moléculaire inconnu devront être testées en se basant sur une solution mère du produit chimique testé à une concentration de 0.5 mg/mL plutôt que 4mM (7) (voir figure 1 et paragraphe 7). Les polymères peuvent également être testés à une concentration de 0.5 mg/mL. Pour les mélanges et les substances multi-constituants de composition inconnue (c.à.d. substances UVCB de composition inconnue ou variable, les produits de réaction complexe ou les matériaux d'origine biologique), la solution d'essai peut être préparée par approche gravimétrique. La substance devra alors être dissoute dans la solution mère à 0.5 mg/mL en prenant en compte le poids total des constituants (excluant le solvant) dans un solvant qui convient. (voir paragraphe 14 et figure 1). Cette concentration de produit chimique de 0.5 mg/mL correspond à un poids moléculaire de 125 mg/mol quand l'ADRA (4mM) est effectué. L'approche gravimétrique de l'ADRA avec ADRA (0.5 mg/mL) a démontré une précision équivalente à l'ADRA (4mM) pour 136 produits chimiques couvrant une large gamme de poids moléculaires (30.03-512.60) (8) (voir paragraphe 7). Cette évaluation de la capacité prédictive de l'approche gravimétrique se base sur les essais de produits chimiques de poids moléculaire défini et non sur les mélanges, puisqu'aucune donnée de référence pour les mélanges n'est disponible. Ainsi, si le mélange à tester est connu pour couvrir une classe chimique de poids moléculaire typique significativement plus élevé, ce poids moléculaire par défaut et la concentration de la solution d'essai devront être ajustés en conséquence [voir par exemple l'approche pour les formulations agrochimiques dans (24)]. L'approche gravimétrique ne devra être employée qu'en dernier recours dans le cas où aucun poids moléculaire agrégé ne peut être calculé. Concernant les essais sur les mélanges, dans la mesure du possible, l'information doit être assemblée sur le potentiel sensibilisant et la réactivité des constituants individuels.

### Préparation du témoin positif, des témoins de référence et des témoins de co-élution

17. Le phénylacétaldéhyde (n° CAS 122-78-1, pureté  $\geq 90\%$ ), ou le diéthyl squarate (n° CAS 5231-87-8, pureté  $> 95\%$ ) est utilisé comme témoin positif (TP) à une concentration de 4 mM dans l'acétonitrile (10). Le phénylacétaldéhyde a tendance à se polymériser et s'oxyder ; il faut donc s'assurer de l'intégrité de l'échantillon lors du stockage et/ou par l'utilisation d'échantillons frais. Le diéthyl squarate doit être conservé à l'abri de la chaleur et de l'humidité, car il est susceptible d'être hydrolysé. D'autres témoins positifs adaptés, donnant des valeurs de déplétion situées dans une fourchette moyenne, peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptabilité comparables pour la séquence. Des témoins de référence comprenant le réactif NAC ou NAL seul dissous dans le solvant approprié doivent en outre être inclus dans la séquence d'analyse CLHP, et seront utilisés afin de s'assurer avant l'analyse que le système CLHP est adapté à l'usage prévu (témoin de référence A), de vérifier la stabilité des témoins de référence dans le temps (témoin de référence B) et d'observer d'éventuels effets du solvant utilisé sur la déplétion de NAC ou NAL (témoin de référence C) (voir Appendice II, Annexe 3). Le taux de déplétion de NAC et NAL pour un produit chimique d'essai est calculé en utilisant un témoin de référence approprié pour

ce produit chimique d'essai (voir paragraphe 23). De plus, un témoin de co-élution comprenant uniquement le produit chimique d'essai sera inclus dans la séquence afin de détecter une éventuelle co-élution du produit chimique d'essai avec le réactif NAC ou NAL.

### Incubation du produit chimique d'essai avec les solutions de NAC et NAL

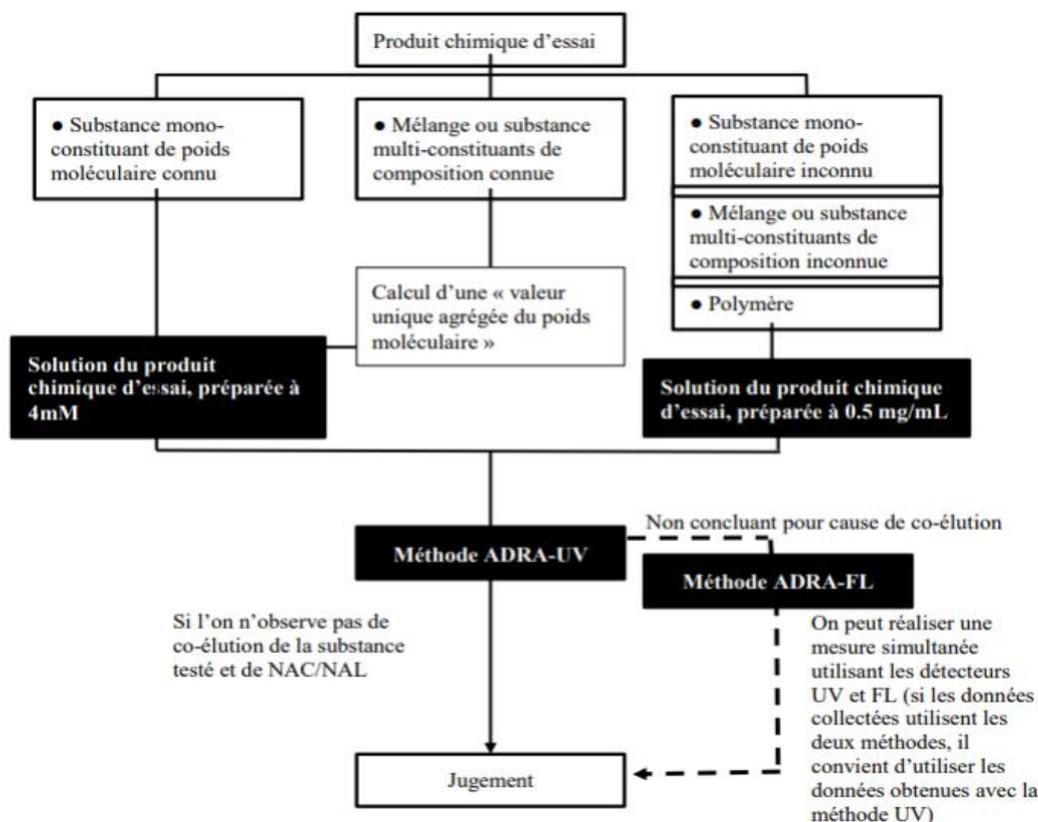
18. Les solutions mères de NAC et NAL sont incubées avec la solution mère de produit chimique d'essai dans un rapport de 3:1, sur une microplaque de 96 puits. Pour la solution mère de produit chimique testé à 4 mM, il en résultera une concentration finale de 1 mM de produit chimique et 5  $\mu$ M de NAC/NAL (17). Pour la solution mères de produit chimique à 0.5 mg/mL, le niveau final du produit chimique est de 0.125 mg/mL. L'observation d'un précipité dès l'addition de la solution de produit chimique d'essai aux solutions de NAC et NAL indique une mauvaise solubilité, ce qui signifie qu'il n'est pas possible d'établir précisément quelle quantité de produit chimique d'essai est contenue dans la solution. Dans ce cas, si des résultats positifs peuvent être utilisés avec confiance, les résultats négatifs sont entachés d'incertitude et aucune conclusion ferme découlant du manque de réactivité ne devrait être dérivée à partir d'un résultat négatif (voir aussi le paragraphe 5 relatif à l'essai de produits chimiques solubles uniquement à des concentrations inférieures à 4 mM). La solution de réaction doit être incubée dans l'obscurité à  $25 \pm 1^\circ$  C pendant  $24 \pm 1$  heures avant que l'on procède à l'analyse CLHP. Après incubation, de l'acide trifluoroacétique (TFA) ( $\geq 98\%$ ) est ajouté à la solution de réaction comme solution d'arrêt pour stopper la réaction (3). 2.5% (v/v) TFA en solution aqueuse est ajouté à la solution de réaction dans un ratio de 1 :4. Ainsi la concentration finale de NAC/NAL et de TFA sont 4  $\mu$ M et 0.5%, respectivement.

### Préparation et analyse CLHP

19. La déplétion de NAC/NAL est suivie par CLHP couplée avec un détecteur UV. Dans le cas où une co-élution de NAC/NAL avec un composé absorbant les UV dans la solution de produit chimique testé, un détecteur de fluorescence est utilisé (11)(12). Il existe deux options pour la détection de NAC/NAL : les mesures successives doivent être commencées avec la détection UV, la détection par fluorescence est seulement employée si des résultats non concluants apparaissent dus à la co-élution. Une alternative est de faire les mesures de façon simultanée en connectant à la fois le détecteur UV et le détecteur FL au système CLHP pour une détection en parallèle. Dans le cas où la co-élution des composés n'a pas lieu, les données UV seules sont utilisées. Dans le cas de résultats non concluants dus à la co-élution sont observés, les données FL sont utilisées. (voir Figure 1). Dans le cas improbable où une co-élution apparaît dans l'essai ADRA-FL, la procédure doit être suivie telle que décrite au paragraphe 28. Chaque produit chimique d'essai doit être analysé en triplicat afin de déterminer le taux de déplétion de NAC et NAL. Bien que l'ajout de solution d'arrêt stoppe la réaction, la mesure de la solution de réaction doit être réalisée dès que possible, et dans tous les cas dans les trois jours suivant l'ajout de la solution d'arrêt. A titre d'exemple, lorsque l'analyse CLHP est réalisée séparément pour NAC et NAL et que l'on utilise deux microplaques de 96 puits, jusqu'à 34 échantillons peuvent être analysés en une fois, comprenant le produit chimique d'essai, le témoin positif et un nombre approprié de témoins solvants, selon le nombre de solvants utilisés dans l'essai, chaque échantillon étant testé en triplicat. Tous les répliqués analysés dans une même séquence doivent utiliser des lots identiques de solution mère de NAC et NAL. Les solutions de produit chimique d'essai et solutions témoins doivent être inspectées visuellement avant l'analyse CLHP et peuvent être centrifugées à vitesse réduite ( $100\text{--}400 \times g$ ) afin qu'un éventuel précipité se dépose au fond du tube, ce qui permet d'éviter que de

grandes quantités de précipité ne bouchent les tubes ou les colonnes du chromatographe. L'observation d'un précipité ou d'une séparation de phase après la période d'incubation indique que la déplétion de NAC et NAL peut être trompeuse ; dans ce cas, les résultats négatifs sont entachés d'incertitude et seront interprétés avec prudence, de même qu'en cas de formation d'un précipité au début de l'incubation (voir ci-dessus).

**Graphique 1. Procédure pour évaluer la déplétion NAC/NAL de ADRA , y compris l'approche gravimétrique pour les mélanges et la détection alternative par fluorescence dans le cas d'une co-élution avec des composés absorbant les UV.**



ADRA, amino acid derivative reactivity assay; UV, ultraviolet; FL, fluorescence

20. Une courbe d'étalonnage doit être établie pour NAC et NAL. Des solutions étalons de NAC et NAL sont préparées dans 20 % d'acétonitrile dans du tampon et avec 0.5 % d'acide trifluoroacétique. On utilisera un tampon phosphate au pH de 8.0 pour NAC et au pH de 10.2 pour NAL. Des solutions mères de NAC et NAL (6.667 µM) seront utilisées, six solutions d'étalonnage seront préparées à des concentrations de 5.0 à 0.156 µM. Un blanc avec du tampon de dilution doit aussi être inclus afin d'établir la courbe d'étalonnage. Une courbe d'étalonnage adaptée aura un coefficient  $R^2 > 0.990$ .

21. Il convient de vérifier avant la conduite de l'analyse si le système CLHP est adapté à l'usage prévu. La déplétion de NAC et NAL est mesurée par CLHP couplée à un détecteur UV (détecteur à barrette de photodiodes ou détecteur à absorbance UV de longueur d'onde fixe égale à 281 nm), et à un détecteur FL

(Ex, 284 nm, et Em, 333nm) (voir paragraphe 19). La colonne appropriée est installée dans le système CLHP avec les spécifications suivantes. Le système de CLHP recommandé, décrit dans le protocole validé, utilise de préférence une colonne à particules de gel de silice de type cœur-enveloppe, taille des particules 2.5~2.7 µm, taille de la colonne 3.0 × 150 mm. Avec cette colonne CLHP à phase inverse, l'ensemble du système doit être équilibré pendant 30 minutes au moins à 40 °C avec 50 % de phase A (0.1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'eau) et 50 % de phase B (0.085 % (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile) avant utilisation. On préparera ensuite la colonne en réalisant un gradient à deux reprises au moins avant l'analyse proprement dite. L'analyse CLHP doit être réalisée à un débit de 0.30 mL/min pour un gradient linéaire allant de 30 % à 55 % d'acétonitrile pour le réactif NAC et de 25 % à 45 % d'acétonitrile pour le réactif NAL pendant 10 minutes, suivi d'une augmentation rapide jusqu'à 100 % d'acétonitrile pour éliminer les autres matériaux. Des volumes égaux de solutions étalons, de solutions de produit chimique d'essai et de solutions témoins sont injectés. La colonne doit être ré-équilibrée aux conditions initiales pendant 6.5 minutes entre les injections. Si une colonne CLHP à phase inverse d'un modèle différent est utilisée, il peut être nécessaire d'ajuster les paramètres ci-dessus pour assurer une élution et une intégration appropriées de NAC et NAL, en particulier le volume injecté, qui peut varier selon le système utilisé (habituellement entre 10 et 20 µL). Il est essentiel, si des paramètres CLHP différents sont utilisés, de démontrer qu'ils sont équivalents au paramétrage validé décrit ci-dessus (de préférence par des essais sur les substances d'épreuve de compétence de l'Appendice II, Annexe 2). Lors de l'utilisation de la méthode de détection UV, l'absorbance est mesurée à 281 nm. Si un détecteur à barrette de photodiodes est utilisé, l'absorbance à 291 nm doit également être relevée. On notera que certains lots d'acétonitrile peuvent avoir une incidence négative sur la stabilité des réactifs NAC and NAL, qui doit être évaluée lorsqu'un nouveau lot d'acétonitrile est utilisé. Le rapport entre l'aire du pic à 281 nm et l'aire du pic à 291 nm peut servir d'indicateur de co-élution. Pour chaque échantillon, un rapport compris entre 90 et 100 % du rapport moyen des aires établi pour les échantillons témoins constitue un bon indicateur de l'absence de co-élution. On trouvera à l'Appendice II, Annexe 3 un exemple de séquence d'analyse CLHP.

22. Certains produits chimiques d'essai peuvent favoriser l'oxydation de la NAC. Le pic de NAC dimérisée peut être suivi visuellement, dans le cas de l'essai ADRA-UV. Cependant, puisque le dimère de NAC ne présente pas de fluorescence, il ne peut pas être détecté dans le mode détection FL. Toute dimérisation apparente sera notée, car une surestimation de la déplétion de NAC peut se traduire par un faux positif (voir paragraphes 4 et 14, Appendice II, Annexe 1).

## RÉSULTATS ET RAPPORTS

### Évaluation des données

23. On établit par photométrie à 281 nm (détection UV), et si nécessaire détection FL avec EXx/Em, 284/333 nm (voir paragraphe 21), pour chaque échantillon la concentration de NAC et NAL, en mesurant l'aire des pics correspondants (surface sous la courbe) et en calculant la concentration de NAC et NAL d'après la courbe d'étalonnage linéaire établie à partir des étalons.

24. On établit le taux de déplétion de NAC et NAL pour chaque échantillon en mesurant l'aire du pic et en la divisant par l'aire moyenne des pics des témoins de référence C correspondants (voir Appendice II, Annexe 3) selon la formule ci-après.

$$\text{Taux de déplétion NAC ou NAL} = \left[ 1 - \left[ \frac{\text{Aire du pic NAC ou NAL pour le réplicat injecté}}{\text{Aire moyenne des pics NAC ou NAL chez les témoins de référence C}} \right] \right] \times 100$$

### Critères d'acceptabilité

25. Les critères suivants doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide:

- a) la courbe d'étalonnage doit avoir un coefficient  $R^2 > 0.990$ ,
- b) le taux moyen de déplétion de NAC et NAL et l'écart type maximal chez les trois réplicats du témoin positif (phénylacétaldéhyde ou diéthyl squarate) doivent respecter les critères suivants :
  - Déplétion NAC

Phénylacétaldéhyde: 30 - 80%; Diéthyl squarate: 30 - 80 %

- Déplétion NAL

Phénylacétaldéhyde: 70 - 100%; Diéthyl squarate: 70 - 100 %

- Ecart type maximal

A la fois pour phénylacétaldéhyde et diéthyl squarate: < 10%, pour la déplétion de NAC et de NAL

- c) la concentration moyenne de NAC et NAL chez les témoins de référence A et C doit être de 3.2–4.4  $\mu\text{M}$  et le coefficient de variation (CV) de l'aire des pics NAC et NAL pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile doit être < 10%.

Si un seul ou plusieurs de ces critères ne sont pas remplis, les données doivent être rejetées et l'essai doit être répété pour le produit chimique testé en question.

26. Les critères suivants doivent être remplis pour que les résultats relatifs à un produit chimique d'essai soient acceptés comme valides :

- a) l'écart type maximal pour les réplicats du produit chimique d'essai doit être < 10 % pour le taux de déplétion de NAC et de NAL,
- b) la concentration moyenne de NAC et de NAL chez les trois témoins de référence C dans le solvant approprié doit être de 3.2–4.4 µM. La gamme admissible pour la concentration moyenne de NAC chez le témoin de référence C quand le solvant utilisé est 5% de DMSO dans l'acétonitrile est de 2.8 à 4.0 µM (19)

Si un seul ou plusieurs de ces critères ne sont pas remplis, les données doivent être rejetées et l'essai doit être répété pour le produit chimique testé en question.

### Modèle prédictif

27. Le taux moyen de déplétion de NAC et de NAL est calculé pour chaque produit chimique d'essai. Une déplétion négative est considérée comme égale à 0 pour le calcul de la moyenne. Si l'on utilise le modèle prédictif NAC/NAL du tableau 1, c'est le seuil de 4.9 % de déplétion moyenne qui sera pris en compte pour l'identification des sensibilisants et des non-sensibilisants cutanés dans le cadre d'une approche IATA ou d'une approche définie. La valeur limite de 4.9% pour le taux moyen de déplétion de NAC et de NAL a été fixée en utilisant deux modèles de classification pour que les sensibilisants et non sensibilisants puissent être prédits de la manière la plus appropriée.

**Tableau 4. Modèle prédictif NAC/NAL<sup>1</sup>**

Taux moyen de déplétion de NAC et NAL	Prédiction ADRA <sup>2</sup>
Inférieur à 4.9 %	Négatif
Égal ou supérieur à 4.9 %	Positif

1 Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.

2 Une prédiction ADRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 2 et 3.

28. Si une co-élution est observée lors de la détection UV ou FL, la valeur de la déplétion mesurée au moyen du détecteur dans lequel la co-élution n'a pas lieu doit être utilisée (voir Figure 1). Si une co-élution est observée avec les deux détecteurs, la co-élution peut être résolue par un léger ajustement du système d'analyse CLHP permettant de mieux séparer les temps de rétention entre le produit chimique d'essai et NAC ou NAL. Si un autre système d'analyse CLHP est employé dans le but de résoudre cette problématique de co-élution, son équivalence au système CLHP validé dans la présente ligne directrice devra être démontrée, de préférence par des essais sur les substances d'épreuve de compétence de l'Appendice II, Annexe 2. En cas de co-élution, il n'est pas possible d'intégrer le pic de NAC ou NAL, donc de calculer les taux de déplétion de NAC et NAL. Si les produits chimiques d'essai donnent lieu à une co-élution avec NAC et NAL, et qu'il n'est pas possible de séparer les temps de rétention, le rapport doit indiquer que l'analyse n'est pas concluante. Dans les cas où la co-élution concerne uniquement NAL et où la séparation des temps de rétention n'est pas possible, le modèle prédictif fondé sur NAC seul (voir tableau 2), peut être utilisé pour les prédictions. Dans ce cas, les données NAC de l'essais ADRA-UV seront néanmoins préférées aux données ADRA-FL. La valeur limite de 5.6% pour le taux moyen de déplétion de NAC a été fixée en utilisant

deux modèles de classification pour que les sensibilisants et non sensibilisants puissent être prédits de la manière la plus appropriée.

**Tableau 5. Modèle prédictif NAC seul<sup>1</sup>**

Taux moyen de déplétion de NAC	Prédiction ADRA <sup>2</sup>
Inférieur à 5.6 %	Négatif
Égal ou supérieur à 5.6 %	Positif

1 Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.

2 Une prédiction ADRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA (13)(14).

29. Lorsque le résultat est sans équivoque, une seule analyse CLHP devrait permettre de déterminer les taux de déplétion de NAC et de NAL pour un produit chimique d'essai. Cependant, lorsque les résultats sont proches de la valeur seuil utilisée pour discriminer les résultats positifs et négatifs (c'est-à-dire taux de déplétion moyen entre 3.0 % et 10.0 % lorsque le modèle de prédiction NAC/NAL est utilisé, ou taux de déplétion de NAC entre 4.0 % et 11.0 % pour le modèle de prédiction NAC seul), il est recommandé de procéder à des essais complémentaires. En particulier en cas de résultat négatif dans ces intervalles (3 % à 4.9% pour le modèle de prédiction NAC/NAL ou 4% à 5.6% pour le modèle de prédiction NAC seul), une deuxième analyse sera menée, ainsi qu'une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières. Dans les cas évoqués ci-dessus, la majorité des trois résultats d'essai est retenue.

## Rapport d'essai

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

### ***Produit chimique d'essai et témoins (témoin positif et solvant/véhicule)***

- Pour toutes les substance mono-constituant (produits chimiques d'essai et témoins):
  - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
  - Propriétés physicochimiques, telles qu'état physique , apparence, hydrosolubilité, 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) ;
  - Concentration(s) testée(s) ;
  - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélanges :
  - Caractérisation 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 et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- Masse moléculaire (ou masse moléculaire apparente) dans le cas de mélanges ou de polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour l'étude ;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage) ;
- Concentration(s) testée(s) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Informations complémentaires pour le témoin positif :
  - Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptation, s'il y a lieu.
- Informations complémentaires pour le témoin solvant/véhicule :
  - Solvant utilisé et teneur de chacun de ses constituants, s'il y a lieu ;
  - Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai ;
  - Impact sur la stabilité de NAC et NAL en cas d'utilisation d'acétonitrile.

#### ***Préparation des solutions de NAC et NAL, de témoin positif et de produit chimique d'essai***

- Caractérisation des solutions de NAC et NAL (fournisseur, lot, poids exact de NAC et NAL, volume ajouté pour préparer la solution mère) ;
- Caractérisation de la solution contenant le témoin positif (poids exact de réactif témoin positif, volume ajouté pour préparer la solution témoin) ;
- Caractérisation des solutions de produit chimique d'essai (poids exact de produit chimique d'essai, volume ajouté pour préparer la solution de produit chimique d'essai).

#### ***Paramètres et analyse CLHP***

- Type de système CLHP, colonne CLHP et colonne de garde, détecteur, auto-échantillonneur ;
- Paramètres pertinents pour l'analyse CLHP, tels que la température de la colonne, les volumes injectés, le débit et le gradient.

#### ***Adéquation du système***

- Aire des pics NAC et NAL à DO 281 nm (détecteur UV) ou Ex/Em de 284/333nm (détecteur FL) pour chaque réplicat d'étalon et de témoin de référence A ;
- Représentation graphique des courbes d'étalonnage linéaires et indication de leur coefficient  $R^2$  ;
- Concentration de NAC et NAL de chaque réplicat du témoin de référence A ;
- Concentration moyenne de NAC et NAL ( $\mu\text{M}$ ) des trois témoins de référence A, écart type et coefficient de variation ;
- Concentration de NAC et NAL des témoins de référence A et C.

#### ***Séquence d'analyse***

- Pour les témoins de référence :
  - Aire des pics NAC et NAL à DO 281 nm (détecteur UV) ou Ex/Em de 284/333nm (détecteur FL) pour chaque réplicat des témoins de référence B et C ;
  - Aire moyenne des pics NAC et NAL à DO 281 nm (détecteur UV) ou Ex/Em de 284/333nm (détecteur FL) pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile, écart type et

- coefficient de variation (vérification de la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse) ;
- Pour chaque solvant utilisé, aire moyenne des pics NAC et NAL à DO 281 nm (détecteur UV) ou Ex/Em de 284/333nm (détecteur FL) pour les trois témoins de référence C appropriés (pour le calcul du taux de déplétion de NAC et NAL) ;
  - Pour chaque solvant utilisé, concentration de NAC et NAL ( $\mu\text{M}$ ) pour les trois témoins de référence C appropriés ;
  - Pour chaque solvant utilisé, concentration moyenne de NAC et NAL ( $\mu\text{M}$ ) pour les trois témoins de référence C appropriés, écart type et coefficient de variation.
- Pour les témoins positifs :
    - Aire des pics NAC et NAL à DO 281 nm (détecteur UV) ou Ex/Em de 284/333nm (détecteur FL) pour chaque réplicat ;
    - Taux de déplétion de NAC et NAL pour chaque réplicat ;
    - Taux moyen de déplétion de NAC et NAL pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation.
  - Pour chaque produit chimique d'essai :
    - Apparence du précipité dans le mélange de réaction à la fin du temps d'incubation, s'il y a lieu. Indiquer si le précipité a été re-solubilisé ou centrifugé ;
    - Présence d'une co-élution ;
    - Description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu ;
    - Aire des pics NAC et NAL à DO 281 nm (détecteur UV) ou Ex/Em de 284/333nm (détecteur FL) pour chaque réplicat ;
    - Taux de déplétion de NAC et NAL pour chaque réplicat ;
    - Taux moyen de déplétion de NAC et NAL pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation ;
    - Moyenne des taux de déplétion NAC et des taux de déplétion NAL ;
    - Modèle prédictif utilisé et prédiction ADRA.

### *Épreuves de compétence*

- Attestation selon laquelle l'établissement responsable du test a démontré sa compétence dans l'utilisation de la méthode d'essai en testant les substances d'épreuve de compétence, avant une application de la méthode d'essai en routine.

### *Discussion des résultats*

- Description de toutes modifications non prévues apportées au mode opératoire
- Discussion des résultats obtenus par la méthode ADRA, en précisant s'ils se situent dans les plages de valeurs spécifiées au paragraphe 28.

### *Conclusions*

## Référence de l'appendice II

- (1) Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70:94-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2014.06.001.
- (2) Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35:1348-60. DOI: 10.1002/jat.3139.
- (3) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *Journal of Applied Toxicology*, 39,191-208. DOI: 10.1002/jat.3707.
- (4) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Nakayama T, Kusao T, Jon R, Kleinstreuer N, Bae-Hwa K, Kojima H, Kasahara T, Ono A, The within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the *in chemico* Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Results of validation study implemented in four participating laboratories, *Journal of Applied Toxicology*, accepted on May 10, 2019.
- (5) OECD (2022), Validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2019), Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Yamamoto Y, Fujita M, Manibuchi S, Katsuoka Y, Ono A, Kasahara T.. (2019), Expanding the applicability of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Determining a weight concentration for preparation of test chemical solutions that yields a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 97, 67-79. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.01.001
- (8) Imamura M, Wanibuchi S, Yamamoto Y, Kojima H, Ono A, Kasahara T and Fujita M (2021), Improving predictive capacity of the Amino acid Derivative Reactivity Assay test method for

skin sensitisation potential with an optimal molar concentration of test chemical solution. *Journal of Applied Toxicology*, 41: 303-329. DOI: 10.1002/jat.4082.

- (9) Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Sozu T, Wanibuchi S, Fujita M, Kasahara T, Ono, A and Kojima H (2022), Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/ml test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.4279. Epub ahead of print.
- (10) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Sozu T, Wanibuchi S, Kasahara T, Ono, A and Kojima H (2022), The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 42: 318-333. DOI: 10.1002/jat.4268.
- (11) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y and Kasahara T (2019), A Newly Developed Means of HPLC-Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitisation Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. *Toxicology In Vitro*, 59, 161-178. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.014.
- (12) Wanibuchi S, Yamamoto Y, Sato A, Kasahara T and Fujita M (2019), The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 821-832. DOI: 10.2131/jts.44.821.
- (13) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Sato A, Akimoto M, Katsuoka Y, Ono A and Kasahara T (2019), Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitisation by combining multiple alternative methods to evaluate key events. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 585-600. DOI: 10.2131/jts.44.585.
- (14) Imamura M, Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Nakashima N, Kojima H, Ono A and Kasahara T (2022), Applicability of ADRA (4mM) for prediction of skin sensitisation by combining multiple alternative methods to evaluate Key events. *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.4283. Epub ahead of print.
- (15) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y and Kasahara T (2019), The underlying factors that explain why nucleophilic reagents rarely co-elute with test chemicals in the ADRA. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 96: 95-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.02.004.
- (16) Yamamoto Y, Wanibuchi S, Sato A, Kasahara T and Fujita M (2019), Precipitation of test chemicals in reaction solutions used in the amino acid derivative reactivity assay and the direct peptide reactivity assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 100: 106624. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.106624.

- (17) ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: [http://www.jacvam.jp/en\\_effort/effort02.html](http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html)
- (18) Tam JP, Wu CR, Liu W and Zhang JW (1991), Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 6657–6662. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00017a044>
- (19) Akimoto M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Kojima H, Ono A, Kasahara T and Fujita M (2020), Oxidation of a cysteine-derived nucleophilic reagent by dimethyl sulfoxide in the amino acid derivative reactivity assay. *J Appl Toxicol.*, 40: 843-854. DOI: 10.1002/jat.3948.
- (20) Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F and Kern P (2013), A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitisation undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33: 1337-52, DOI:10.1002/jat.2868.
- (21) Gerberick GF, Vassalo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG and Lepoittevin J-P (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach, *Toxicological Sciences*, 97: 417-427. DOI: 10.1093/toxsci/kfm064.
- (22) Basketter DA, Scholes EW (1992), Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens, *Food and Chemical Toxicology*, 30: 65-69.
- (23) ECETOC (2003), Contact sensitisation: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (24) Strickland J, Truax J, Corvaro M, Settivari R, Henriquez J, McFadden J, Gullledge T, Johnson V, Gehen S, Germolec D, Allen DG, Kleinstreuer N. Application of Defined Approaches for Skin Sensitization to Agrochemical Products. *Front Toxicol.* 2022 May 2;4:852856. doi: 10.3389/ftox.2022.852856. PMID: 35586187; PMCID: PMC9108145.

## APPENDICE II, ANNEXE 1

## Limites connues de l'essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés (ADRA)

Le tableau suivant résume les limites connues de ADRA.

Classe de substances / interférence	Cause de sous-estimation ou d'interférence potentielle	Interprétation des données	Exemple de substance
Métaux et composés inorganiques	Connus pour réagir avec les protéines via des mécanismes autres que la liaison covalente	L'essai n'est pas applicable	Sulfate de nickel ; 7786-81-4
Pro-haptènes	Produits chimiques d'essai dont il est démontré qu'ils requièrent une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée. Ils ne sont pas détectés par la méthode d'essai sauf si l'activation est causée par auto-oxydation à un degré similaire à celui qui se produit in vivo/chez l'homme. Néanmoins, on ne saura pas en général si c'est le cas ou pas.	Peut conduire à des faux négatifs. Les résultats négatifs obtenus par la méthode d'essai devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et en lien avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA.	Diéthylènetriamine ; 111-40-0 (1A chez l'homme, LLNA n/a)
Pré-haptènes	Les produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) apparaissent comme correctement identifiés dans certains cas par la méthode d'essai		Linalool: 78-70-6
Produits chimiques qui ont une absorbance UV (DO 281 nm( ou FL (Ex/Em 284/333 nm) et le même temps de rétention que le NAC ou NAL (co-élution)	Dans les cas de co-élution, le pic du NAC ou NAL ne peut pas être intégré, et il n'est pas possible de calculer le pourcentage de déplétion de NAC ou NAL.	Les substances qui absorbent les UV dans cette gamme du spectre sont généralement limitées à celles qui présentent une double liaison conjuguée, ce qui réduit notablement le potentiel de co-élution. Les substances qui ont une FL dans cette gamme sont généralement limités aux composés polyaromatiques ou polyhétérocycliques, y compris les dérivés du naphthalène. Si les produits chimiques d'essai donnent lieu à une co-élution avec NAC et NAL, ou seulement avec NAC, le rapport doit indiquer que l'analyse n'est pas concluante et il faudra considérer un ajustement du système d'analyse CLHP (voir paragraphe 28). Dans les cas où la co-élution concerne uniquement NAL le modèle prédictif fondé sur NAC seul décrit dans le tableau 2), peut être utilisé pour les prédictions.	Safranal; 116-26-7
Mélanges complexes de composition inconnue, substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques	L'essai ADRA utilisant une solution mère à 4mM nécessite un ratio molaire de produit chimique et réactif nucléophile, mais l'essai ADRA utilisant une solution à 0.5 mg/mL ne nécessite pas de ratio molaire de produit chimique testé et peut prédire la	L'essai n'est pas applicable	Substances UVCB, émissions chimiques, produits ou mélanges de composition variable ou

	sensibilisaiton cutanée des produits chimiques testés qui sont préparés à une concentration massique de 0.5 mg/mL. Lorsqu'un mélange est à l'état liquide, l'évaluation de la sensibilisation au moyen de l'essai ADRA ne peut pas s'effectuer si le poids total des composés du mélange dissous dans le solvant (eau, solution de dissolution, solvant d'extraction, etc.) n'est pas connu, puisqu'il sera alors impossible de préparer une solution de produit chimique à 0.5 mg/mL.		incomplètement connue
Produits chimiques d'essai qui ne peuvent être dissouts dans un solvant approprié à une concentration finale de 4 mM.	Il n'est pas certain qu'une exposition suffisante soit atteinte. Lorsqu'un mélange est à l'état liquide et le poids total des composés du mélange dissous dans le solvant (eau, solution de dissolution, solvant d'extraction, etc.) n'est pas connu, il est alors impossible de préparer une solution de produit chimique à 0.5 mg/mL, et par conséquent le potentiel sensibilisant ne peut pas être évalué par l'essai ADRA.	La méthode d'essai ADRA est applicable aux produits chimiques peu solubles Les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent être testés à des concentrations plus basses auxquelles ils sont solubles. Dans ce cas, un résultat positif pourra quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif.	n.d.
Produits chimiques qui précipitent dans la solution de réaction.	Il n'est pas certain qu'une exposition suffisante soit atteinte	Les produits chimiques qui précipitent en solution de réaction bien que dissout dans le solvant peuvent être testés à des concentrations plus basses auxquelles ils sont solubles. Dans ce cas, un résultat positif pourra quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif.	Myristate d'isopropyl CAS: 110-27-0
Produits chimiques qui ne se lient pas de façon covalente au NAC mais qui facilitent son oxydation (p.ex. NAC dimerisation)	Peuvent amener à une surestimation potentielle de la déplétion en NAC, pouvant mener à un résultat faussement positif	La CLHP (détection UV) devrait permettre de détecter et quantifier tout dimère de NAC formé, et ainsi de confirmer ou d'exclure une déplétion liée à une dimérisation oxydative et non à une réaction et une liaison covalente avec la ou les substance(s) d'essai. De ce fait, l'ADRA permettrait d'éviter un jugement inexact lié à l'action oxydante du produit chimique d'essai. Cependant, puisque le dimère de NAC n'a pas de fluorescence, il peut uniquement être détecté par l'essai ADRA UV.	DMSO Oxydant
Produits chimiques qui sont solubles uniquement dans le DMSO	Le DMSO conduit à une déplétion excessive du NAC à cause de sa dimérisation, ce qui entraine un bruit de fond de déplétion en NAC élevé	Le DMSO peut être contenu dans la solution du produit chimique d'essai jusqu'à 5%. Si le DMSO est choisi, il faudra essayer de solubiliser le produit chimique d'essai dans un mélange 1:20 de DMSO et d'acétonitrile (5% de DMSO dans l'acétonitrile)	n.d.

## APPENDICE II, ANNEXE 2

## Substances d'épreuve de compétence

Sensibilisation cutanée *in chemico* : essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés  
(Amino acid Derivative Reactivity Assay, ADRA)

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai, les laboratoires doivent apporter la preuve de leur compétence technique en obtenant les prédictions attendues par la méthode ADRA pour les 10 substances d'épreuve recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de déplétion de NAC et NAL se situant dans les domaines de référence respectifs de ces deux grandeurs pour au moins 8 des 10 substances d'épreuve de compétence. Le teste permettant de démontrer les compétences techniques dans la conduite de l'essai ADRA se résume à l'essai ADRA effectué à 4mM (10). Si l'essai ADRA à 4mM est démontré comme maîtrisé grâce aux substances d'épreuve de compétence, l'essai ADRA à 0.5 mg/m : n'a pas besoin d'être conduit pour démontrer les compétences techniques (9). Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter l'ensemble de 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, la qualité élevée des données de référence *in vivo* disponibles et des données *in vitro* obtenues par la méthode ADRA, ainsi que l'utilisation de ces substances dans l'étude de validation coordonnée par le JaCVAM pour démontrer que la méthode d'essai a été mise en œuvre avec succès.

**Tableau 6. Substances recommandées pour démontrer la compétence technique des laboratoires dans la mise en œuvre de la méthode ADRA à 4mM**

N°	Produits chimiques d'essai	Numéro CAS	État physique	Masse moléculaire	Prédiction <i>in vivo</i> <sup>1</sup>	Prédiction ADRA <sup>2</sup>	Domaine des taux de déplétion	
							NAC <sup>3</sup>	NAL <sup>3</sup>
1	<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	solide	108.09	Sensibilisant (extrême)	Positif	90-100	70-100
2	Diphenylcyclopropenone	886-38-4	solide	206.24	Sensibilisant (extrême)	Positif	50-90	≤ 10
3	2-Méthyl-2H-isothiazol-3-one	2682-20-4	solide	115.15	Sensibilisant (fort)	Positif	80-100	≤ 10
4	Chlorure de palmitoyle	112-67-4	liquide	274.87	Sensibilisant (modéré)	Positif	≤ 40	70-100
5	Imidazolidinylurée	39236-46-9	solide	388.29	Sensibilisant (faible)	Positif	40-70	≤ 20
6	Farnésal	19317-11-4	liquide	220.35	Sensibilisant (faible)	Positif	60-100	5-40
7	Glycérol	56-81-5	liquide	92.09	Non sensibilisant	Négatif	≤ 7	≤ 7
8	Alcool benzylique	100-51-6	liquide	108.14	Non sensibilisant	Négatif	≤ 7	≤ 7
9	Isophthalate de diméthyle	1459-93-4	solide	194.19	Non sensibilisant	Négatif	≤ 7	≤ 7
10	Propyl parabène	94-13-3	solide	180.20	Non sensibilisant	Négatif	≤ 7	≤ 7

<sup>1</sup> La prédiction du risque (et de la puissance) de sensibilisation *in vivo* est fondée sur les données ELGL (20) (21) (22). La puissance *in vivo* est déterminée au moyen des critères proposés par ECETOC (23).

<sup>2</sup> Une prédiction ADRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 3 et 5.

<sup>3</sup> Intervalles déterminés sur la base d'au moins 10 valeurs de déplétion établies par 5 laboratoires indépendants.

## APPENDICE II, ANNEXE 3

### EXEMPLES DE SÉQUENCE D'ANALYSE

Pour chaque échantillon analysé par CLHP, on procédera à l'analyse en suivant l'ordre des numéros ci-après. Les exemples de séquences d'analyse CLHP du tableau ont pour objet de faciliter le déroulement pratique de l'analyse.

1. Commencer par l'analyse des étalons et témoins de référence A (N = 3).
2. Il n'est pas nécessaire d'analyser les témoins de co-élution à tour de rôle s'ils sont analysés après la solution étalon et le témoin de référence A.
3. Le témoin de référence B sera analysé trois fois (six fois en tout) avant et après analyse de l'échantillon, du témoin de référence C et du témoin positif.
4. Les solutions de témoin de référence C, de témoin positif et de produit chimique d'essai sont analysées. (Après analyse de la première série de répliqués de chaque échantillon, on analysera la deuxième série de répliqués de chaque échantillon).

<b>Étalons et témoins de référence</b>	Étalon 1 Étalon 2 Étalon 3 Étalon 4 Étalon 5 Étalon 6 Tampon de dilution Témoin de référence A, rép. 1 Témoin de référence A, rép. 2 Témoin de référence A, rép. 3
<b>Témoins de co-élution</b>	Témoin de co-élution 1 pour le produit chimique d'essai 1 Témoin de co-élution 2 pour le produit chimique d'essai 2
<b>Témoins de référence</b>	Témoin de référence B, rép. 1 Témoin de référence B, rép. 2 Témoin de référence B, rép. 3
<b>Première série de répliqués</b>	Témoin de référence C, rép. 1 Phénylacétaldéhyde, rép. 1 Échantillon 1, rép. 1 Échantillon 2, rép. 1
<b>Deuxième série de répliqués</b>	Témoin de référence C, rép. 2 Phénylacétaldéhyde, rép. 2 Échantillon 1, rép. 2 Échantillon 2, rép. 2
<b>Troisième série de répliqués</b>	Témoin de référence C, rép. 3 Phénylacétaldéhyde, rép. 3 Échantillon 1, rép. 3 Échantillon 2, rép. 3
<b>Témoins de référence</b>	Témoin de référence B, rép. 4 Témoin de référence B, rép. 5 Témoin de référence B, rép. 6

Trois séries de témoins de référence (NAC ou NAL dissous dans le solvant approprié) doivent être incluses dans la séquence d'analyse :

**Témoin de référence A :** témoin permettant de vérifier la validité du système de CLHP. Le témoin de référence A est utilisé pour vérifier la concentration de NAC et NAL pour chaque courbe d'étalonnage après addition d'acétonitrile au lieu du produit chimique d'essai.

**Témoin de référence B :** témoin permettant de vérifier la stabilité de la solution de réaction soumise à l'analyse. Le témoin de référence B est utilisé pour vérifier la variabilité (CV) de l'aire de chacun des trois pics NAC/NAL dans la solution après addition d'acétonitrile au lieu du produit chimique d'essai, au début et à la fin de l'analyse.

**Témoin de référence C :** témoin permettant de calculer la déplétion de NAC/NAL pour chaque solution de produit chimique d'essai. Pour calculer la déplétion de NAC/NAL, mesurer trois témoins de référence C après addition de solvant au lieu du produit chimique d'essai. Préparer un témoin de référence C pour tous les solvants utilisés pour dissoudre les produits chimiques d'essai.

## APPENDICE III

**Sensibilisation cutanée : essai cinétique de liaison directe sur la réactivité peptidique  
(kinetic Direct Peptide Reactivity Assay, kDPRA)****REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES**

1. La méthode d'essai kDPRA est proposée pour l'étude de l'événement moléculaire initiateur dans l'AOP sensibilisation cutanée – à savoir la réactivité aux protéines – par quantification de la réactivité des produits chimiques d'essai vis-à-vis d'un modèle peptidique de synthèse contenant de la cystéine, en fonction du temps et de la concentration (1) (2). Les constantes de vitesse de la réaction sont calculées et le logarithme de la constante de vitesse maximale (log valeur  $k_{max}$  en  $s^{-1}M^{-1}$ ) obtenu pour chaque produit chimique d'essai est utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants de la sous-catégorie 1A (sous-catégorie 1A) du SGH de l'ONU de ceux qui ne sont pas sous-catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A), c'est-à-dire ceux de la sous-catégorie 1B (sous-catégorie 1B) du SGH de l'ONU ou non classés selon le SGH de l'ONU (3). Sur la base de considérations théoriques, la constante de vitesse de la réaction entre un produit chimique et les protéines de la peau va déterminer la quantité d'épitope formé à partir d'une quantité donnée de produit chimique ou, à l'inverse, va déterminer la dose nécessaire à former la quantité d'épitope nécessaire à l'induction de la sensibilisation ; il s'agit donc d'une étape de détermination de la puissance. Sur la base de données expérimentales, l'évaluation de 180 produits chimiques a montré que la constante de vitesse apparaît comme le déterminant de puissance le plus robuste parmi tous les paramètres mesurés évalués dans les Lignes directrices 442C, 442D et 442E de l'OCDE (3).

2. Il a été démontré que la méthode d'essai kDPRA est transférable à des laboratoires sans qu'une formation spécifique soit nécessaire (4). Pour les 24 produits chimiques testés lors de la phase de validation, la reproductibilité intralaboratoire globale du kDPRA pour l'attribution de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU était de 96 %, et la reproductibilité interlaboratoire moyenne de 88 % (4). D'après les résultats de l'étude de validation (4) et d'autres études publiées (3), couvrant un total de 180 produits chimiques d'essai appartenant au domaine d'applicabilité du kDPRA, cet essai permet de distinguer les sensibilisants cutanés de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU de ceux qui ne sont pas sous-catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A) selon le SGH de l'ONU avec une exactitude équilibrée de 85 %, une sensibilité de 84 % (38/45) et une spécificité de 86 % (116/135), par comparaison avec les résultats de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) (3). Des performances similaires ont été obtenues en comparant les résultats du kDPRA avec les données de la base ELGL compilée dans le contexte de la Ligne directrice de l'OCDE sur les approches définies pour la sensibilisation cutanée (15)<sup>2</sup>. De plus, la prédiction effectuée pour 123 produits chimiques d'essai (sur les 180) pour lesquels on dispose de données humaines sur la sensibilisation cutanée (5) (6) présente une exactitude équilibrée de 76 %, une sensibilité de 64 % (21/33) et

---

<sup>2</sup> Une exactitude équilibrée de 85 %, une sensibilité de 82 % (31/38) et une spécificité de 88 % (102/116) ont été calculées par rapport à l'ensemble des données ELGL compilées dans le contexte de la Ligne directrice sur les approches définies pour la sensibilisation cutanée (15).

une spécificité de 89 % (80/90) (3), même si les données de référence humaines sont entachées d'une incertitude significative<sup>3</sup>. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il faut tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale peuvent ne pas refléter parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, en l'occurrence l'espèce humaine. À titre comparatif, sur l'ensemble des données relatives aux 123 produits chimiques ayant servi à évaluer le kDPRA d'après le potentiel sensibilisant chez l'homme, l'ELGL présente une exactitude équilibrée de 73 %, une sensibilité de 55 % (18/33) et une spécificité de 91 % (82/90) pour l'identification des produits de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU. L'examen de toutes les données disponibles a montré que le domaine d'applicabilité du kDPRA recouvre une grande variété de groupes fonctionnels organiques, de mécanismes de réaction, de puissances de sensibilisation cutanée (déterminées lors d'études *in vivo*) et de propriétés physicochimiques (3). Une revue indépendante par des pairs (16) a établi la validité scientifique du kDPRA pour distinguer les sensibilisants cutanés appartenant à la sous-catégorie 1A du SHG de l'ONU de ceux n'appartenant pas à cette catégorie (non-sous-catégorie 1A) selon le SGH de l'ONU (7). Le kDPRA peut donc être utilisé, en fonction du cadre réglementaire : (i) en complément d'autres méthodes d'essai, pour sous-catégoriser des produits chimiques identifiés comme sensibilisants cutanés de catégorie 1 selon le SGH de l'ONU ou (ii) isolément, pour classer directement, en se fondant sur les résultats positifs, un produit chimique dans la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU.

3. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé, sans référence à l'applicabilité du kDPRA aux substances et/ou aux mélanges. En l'occurrence, cette méthode d'essai n'est pas applicable aux composés métalliques, connus pour réagir avec les protéines via des mécanismes autres que la liaison covalente. En outre, le kDPRA mesure la réactivité avec les peptides à cystéine uniquement ; de ce fait, les sensibilisants forts réagissant exclusivement avec la lysine, tels que certains halogénures d'acyle, esters phénoliques ou aldéhydes, sont en dehors du domaine d'applicabilité du kDPRA. Cependant, seuls quelques sensibilisants cutanés de sous-catégorie 1A selon le SGH de l'ONU sont connus à ce jour pour réagir exclusivement avec les résidus de lysine. De plus, il est possible de réduire l'incertitude en utilisant le DPRA ou l'ADRA dans une démarche séquentielle pour identifier les cas de forte réactivité exclusivement avec la lysine. Les produits chimiques qui ne se lient pas de façon covalente au peptide mais qui facilite son oxydation (p.ex. la dimerisation de la cystéine) peuvent amener à une surestimation potentielle de la déplétion en peptide, pouvant mener à un résultat faussement positif et/ou une assignation du produit chimique d'essai à une classe de réactivité supérieure. La méthode d'essai décrite dans le présent Appendice de la Ligne directrice est une méthode *in chemico*, qui ne fait pas intervenir de système métabolique. Elle ne permet pas de détecter de façon fiable la réactivité des produits chimiques requérant une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée (pro-haptènes). Néanmoins, il a été observé que cette limite concernant la détection des pro-haptènes était moins marquée dans le cas des sensibilisants forts que dans celui des sensibilisants faibles (3). D'après les données publiées, la majorité des produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) sont correctement identifiés par les méthodes d'essai *in chemico* (8) (9). Cependant les pré-haptènes qui s'oxydent spontanément et rapidement peuvent être sous-évalués par le kDPRA (comme par tout essai de sensibilisation cutanée *in vitro*), en raison d'une phase de latence liée à l'oxydation qui se traduit

---

<sup>3</sup> Une exactitude équilibrée de 67 %, une sensibilité de 53 % (9/17) et une spécificité de 81 % (25/31) ont été établies par rapport à l'ensemble de données humaines relatives à la sensibilisation cutanée compilées dans le contexte de la Ligne directrice sur les approches définies pour la sensibilisation cutanée (15).

par une réduction de la vitesse de réaction globale. A la lumière de ce qui précède, il convient de tenir compte des limites suivantes, identifiées à ce jour (voir aussi l'Annexe 1 du présent Appendice), quand on interprète des résultats obtenus avec la méthode d'essai qui ne conduisent pas à une sous-catégorisation 1A :

- si le produit est une amine aromatique, un catéchol ou une hydroquinone, des données complémentaires peuvent être nécessaires pour confirmer une faible réactivité même dans des conditions favorisant l'oxydation ;
- si le produit est un halogénure d'acyle, un ester phénolique ou un aldéhyde réagissant spécifiquement avec les résidus de lysine selon le DPRA ou l'ADRA, par exemple, des données complémentaires peuvent être nécessaires pour confirmer une faible réactivité.

4. Les produits chimiques d'essai doivent être solubles dans un solvant approprié à une concentration finale de 20 mM (voir les paragraphes 12-13). Les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent néanmoins être testés à des concentrations plus basses, à condition qu'une constante de vitesse maximale (valeur  $k_{\max}$  en  $s^{-1}M^{-1}$ ) puisse être établie d'après la cinétique de la réaction, comme prévu par le kDPRA pour tout produit chimique d'essai (voir le paragraphe 24). Dans ce cas, un résultat positif menant à une prédiction de sensibilisant cutané de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU (c'est-à-dire  $\log k_{\max} \geq -2.0$ ) pourra toujours être utilisé, mais aucune conclusion définitive ne pourra être tirée d'un résultat négatif (c'est-à-dire absence de réactivité ou  $\log k_{\max} < -2.0$ ).

5. Le kDPRA fait appel à une lecture de la fluorescence qui nécessite de prêter attention à l'incidence éventuelle d'une autofluorescence, d'une extinction de fluorescence ou d'une interaction du produit chimique d'essai avec le réactif (le monobromobimane). Il importe notamment de prévoir pour le produit chimique étudié les différents témoins spécifiés au paragraphe 16, et d'évaluer dans quelle mesure la déplétion peptidique établie dépend du temps d'incubation. Les produits chimiques d'essai comportant un groupe SH primaire (thiols) ne peuvent pas être testés par le kDPRA, car le groupe thiol peut interagir avec le monobromobimane (voir le paragraphe 8) et ainsi intensifier la fluorescence. Les produits chimiques qui se décomposent dans les conditions de l'essai (conditions neutres, aqueuses) et libèrent des groupes SH libres tendent à poser le même problème.

6. On considère que le kDPRA est techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges de composition connue, bien que de telles substances n'aient pas été testées durant les études de validation. Dans ce cas, un seul degré de pureté est établi d'après la somme des pourcentages relatifs de leurs constituants (à l'exception de l'eau) et une seule masse moléculaire apparente est établie à partir de la masse moléculaire de chacun des constituants du mélange (à l'exception de l'eau) et de leurs proportions respectives. La pureté et la masse moléculaire apparente obtenues sont alors utilisées pour calculer le poids de produit chimique d'essai nécessaire pour préparer une solution à 20 mM. Les résultats obtenus avec les mélanges et substances multi-constituants de composition connue peuvent mener à une relation concentration-réponse non linéaire, de sorte que les réserves énoncées au paragraphe 27(ii) doivent être utilisées. Le modèle prédictif actuel n'est pas applicable aux mélanges complexes de composition inconnue ni aux substances de composition inconnue ou variable, aux produits de réaction complexes ou aux matériels biologiques (substances UVCB), compte tenu des quotients molaires définis entre le produit chimique d'essai et le peptide. Quoiqu'il en soit, avant d'appliquer la méthode d'essai à des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester (parce qu'instables, par exemple) ou des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette Ligne directrice, il convient d'examiner si les résultats obtenus seront scientifiquement valables. Enfin, s'il est démontré que la méthode d'essai n'est pas applicable à d'autres catégories de produits chimiques, il conviendra de ne pas l'utiliser pour tester ces produits.

7. Le kDPRA peut être utilisé pour distinguer les sensibilisants cutanés de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU de ceux qui ne sont pas sous-catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A) selon le SGH de l'ONU (3). Comme pour toute méthode d'essai basée sur les événements clés, il conviendra d'évaluer plus précisément la performance du kDPRA lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres essais tels que le DPRA, ou dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA ou DA pour une analyse plus complète de la sensibilisation cutané.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Le kDPRA est une version modifiée de la méthode d'essai *in chemico* DPRA (décrite à l'Appendice I de la présente Ligne directrice). Il utilise le même peptide à cystéine que celui utilisé pour le DPRA (Ac-RFAACAA-COOH), mais n'utilise pas de peptide contenant de la lysine. Les concentrations finales du peptide d'essai (0.5 mM) et du milieu de réaction (25 % d'acétonitrile dans un tampon phosphate) sont identiques dans le kDPRA et le DPRA. Alors que dans le DPRA, la mesure est effectuée à une seule concentration du produit chimique d'essai (5 mM pour le peptide à cystéine) et à un seul point dans le temps ( $\geq 24$  h), le kDPRA comporte des réactions parallèles à cinq concentrations différentes (5, 2.5, 1.25, 0.625 et 0.3125 mM), et des mesures à six points dans le temps (10, 30, 90, 150, 210 et 1440 min), à une température de  $25 \pm 2.5$  °C. La concentration résiduelle de peptide à cystéine à l'issue de chaque temps de réaction est mesurée après arrêt de la réaction par ajout de monobromobimane (mBrB ; CAS 74235-78-2). Hautement réactif et non fluorescent, le mBrB réagit rapidement avec les fractions de cystéine non liées du modèle de peptide, pour former un complexe fluorescent, que l'on mesure pour quantifier la concentration de peptide non déplété. Si, à la concentration la plus élevée, la déplétion dépasse le seuil de 13.89 % (seuil de positivité retenu dans le modèle prédictif du DPRA pour la cystéine seule) tout en étant statistiquement significative par rapport à celle des témoins avec peptide seul, d'autres calculs sont effectués (dans le cas contraire, le produit chimique d'essai est considéré comme non réactif, conformément au modèle prédictif du paragraphe 28). On représente graphiquement le logarithme népérien des concentrations de peptide non déplété en fonction de la concentration de produit chimique d'essai à chaque point dans le temps. Si une relation linéaire est observée (coefficient de corrélation  $> 0.90$ ), on détermine la pente de la courbe et on la divise par le temps d'incubation pour obtenir la constante de vitesse en  $[\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}]$ . On convertit cette valeur en constante de vitesse en  $[\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}]$  et on en calcule le logarithme. La valeur maximale observée sur l'ensemble des points dans le temps est définie comme le  $\log k_{\text{max}}$ , et cette constante de vitesse maximale constitue le résultat primaire de l'essai. Elle fournit une quantification de la vitesse maximale de réaction du produit chimique d'essai avec le peptide d'essai. Les vitesses de la réaction de déplétion du peptide à cystéine sont ensuite utilisées pour distinguer les sensibilisants cutanés de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU de ceux qui ne sont pas sous-catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A) selon le SGH de l'ONU. La prédiction « sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU » s'applique aux produits chimiques ayant un  $\log k_{\text{max}} \geq -2.0$ . Il est également possible d'utiliser la constante de vitesse dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA ou DA, afin d'évaluer la puissance de sensibilisation d'un produit chimique d'essai sur une échelle continue, pour les besoins de l'évaluation des risques (3) (10).

9. Avant d'utiliser cette méthode d'essai en routine, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en appliquant la méthode aux neuf substances d'épreuve de compétence listées à l'Annexe 2 du présent Appendice.

## MODE OPÉRATEUR

10. La présente méthode d'essai est basée sur le protocole kDPRA DB-ALM n° 217 (11), qui est celui utilisé pour l'étude de validation coordonnée par l'industrie. Il est recommandé d'utiliser ce protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de la méthode au laboratoire. Les principales composantes et procédures du kDPRA sont décrites dans ce qui suit.

### Préparation du peptide à cystéine

11. La solution mère du peptide de synthèse à cystéine (Ac-RFAACAA-COOH), de pureté égale ou supérieure à 95 %, doit être fraîchement préparée juste avant d'être incubée avec le produit chimique d'essai. La concentration finale du peptide à cystéine doit être de 0.667 mM dans un tampon phosphate de pH 7.5 pour les produits chimiques solubles dans l'acétonitrile et de 1.0 mM pour les produits chimiques solubles dans le tampon phosphate de pH 7.5.

### Préparation du produit chimique d'essai

12. Avant de conduire l'essai, il convient d'évaluer la solubilité du produit chimique d'essai dans un véhicule approprié. Ce véhicule doit être non réactif, miscible à l'eau, capable de dissoudre complètement le produit chimique d'essai. Un examen visuel permet de s'assurer de la solubilité, la formation d'une solution claire étant considérée comme suffisante pour vérifier que le produit chimique d'essai est bien dissous. Le véhicule à préférer est l'acétonitrile. Lorsqu'une substance n'est pas soluble dans l'acétonitrile, il convient d'évaluer la solubilisation dans un tampon phosphate de pH 7.5. Aucun autre véhicule n'a été testé pour l'instant, mais il est possible d'en utiliser un autre s'il est démontré qu'il n'interfère pas avec l'essai ; tous les témoins, en particulier, devront être préparés avec le même véhicule et les taux de réaction obtenus pour le témoin positif et pour les substances d'épreuve de compétence devront être compris dans les intervalles décrits respectivement au paragraphe 26 et à l'Annexe 2 du présent Appendice. Il est important de noter qu'il est préférable d'éviter l'utilisation du DMSO comme véhicule, car il peut provoquer la dimérisation du peptide.

13. Le produit chimique d'essai est pré-pesé dans des flacons en verre et dissous immédiatement avant l'essai dans un véhicule approprié, conformément au paragraphe 12, afin d'obtenir une solution à 20 mM. Les dilutions du produit chimique d'essai sont préparées par dilution en série afin d'obtenir les concentrations de 20, 10, 5, 2.5 et 1.25 mM.

### Préparation des témoins

14. L'aldéhyde cinnamique (n° CAS 104-55-2 ; pureté grade alimentaire  $\geq 95$  %) est utilisé comme témoin positif (TP). Il est dissous à une concentration de 20 mM dans l'acétonitrile immédiatement avant l'essai. Des dilutions en série sont ensuite préparées pour obtenir des concentrations de TP de 20, 10, 5, 2.5 et 1.25 mM. L'utilisation d'autres témoins positifs n'est pas recommandée dans la mesure où dans cet essai, on mesure un taux de réaction exact ; de ce fait une utilisation uniforme du témoin positif permet une comparaison quantitative entre laboratoires, avec les données obtenues lors de l'étude de validation et en tant que contrôle historique intra-laboratoire.

15. Un témoin véhicule (TV), considéré comme le témoin négatif, est constitué du peptide dissous dans le tampon et dans le véhicule respectivement, mais sans produit chimique d'essai ni TP. La déplétion peptidique d'échantillons incubés avec le produit chimique d'essai ou le TP est calculée par rapport au TV correspondant.

16. L'essai comprend également des témoins pour le produit chimique d'essai aux différentes concentrations testées, dans le véhicule utilisé et dans le tampon, mais sans peptide. Cet ensemble de témoins doit permettre d'identifier d'éventuelles interférences du produit chimique d'essai avec la mesure de fluorescence (autofluorescence et extinction), afin d'évaluer notamment l'interférence avec le monobromobimane et de disposer d'une mesure de base.

17. Un témoin blanc (TB) utilisé comme mesure de base est préparé avec le véhicule et le tampon, mais sans produit chimique d'essai, TP ou peptide.

### Incubation du produit chimique d'essai avec la solution de peptide à cystéine

18. Des dilutions en série du produit chimique d'essai et du TP sont préparées sur une plaque microtitre 96 puits, dite « plaque d'application ». Des plaques noires 96 puits supplémentaires, dites « plaques d'essai », sont préparées chacune pour l'une des durées d'exposition, avec ajout des différents réactifs (solution mère de peptide, véhicule et solution tampon) selon une configuration prédéfinie recommandée dans le protocole kDPRA (11). Chaque concentration du produit chimique d'essai sera analysée en triplicat. La réaction débute avec le transfert des dilutions du produit chimique d'essai et du TP de la plaque d'application aux plaques d'essai. Si un précipité est observé dès l'ajout de la solution de produit chimique d'essai à la solution de peptide, du fait d'une faible hydrosolubilité du produit chimique d'essai, il n'est pas possible de savoir quelle quantité de produit chimique d'essai reste dans la solution et peut réagir avec le peptide. Dans ce cas, un résultat positif (c'est-à-dire  $\log k_{\max} \geq -2.0$ ) pourra être utilisé, mais un résultat négatif (c'est-à-dire absence de réactivité ou  $\log k_{\max} < -2.0$ ), devra être interprété avec prudence (voir également les réserves du paragraphe 4 concernant l'utilisation du kDPRA avec des produits chimiques non solubles jusqu'à une concentration finale de 20 mM). Après ajout du produit chimique d'essai et du TP, les plaques sont scellées par un film adhésif étanche aux gaz et agitées au minimum à 200 rpm pendant 5 min. La solution des plaques d'essai est incubée dans l'obscurité à  $25 \pm 2.5$  °C pendant les différentes durées d'incubation (d'exposition) (c'est-à-dire 10, 30, 90, 150, 210 et 1440 min) avant ajout de la solution de mBrB. Les durées d'incubation peuvent être adaptées afin d'examiner les points dans le temps les plus pertinents pour un produit chimique donné (par exemple des durées d'incubation plus courtes peuvent mieux convenir pour des produits chimiques réagissant rapidement). Cependant, le point dans le temps de 1440 min doit toujours être testé car il correspond à la durée d'incubation du DPRA. La durée d'incubation (d'exposition) est le temps écoulé depuis le transfert des dilutions de produit chimique d'essai et de TP aux plaques d'essai jusqu'à l'ajout de mBrB.

### Mesure de la fluorescence

19. Lorsque la durée d'incubation (d'exposition) souhaitée est atteinte, une solution de mBrB fraîchement préparée (3 mM dans l'acétonitrile) est ajoutée rapidement dans les puits des plaques d'essai (une par durée d'exposition), dans l'obscurité. Les plaques sont scellées par un film adhésif étanche aux gaz,

et agitées au minimum à 200 rpm pendant 5 min. L'intensité de fluorescence est déterminée avec un filtre d'excitation à 390 nm et un filtre d'émission à 480 nm.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Évaluation des données

20. Pour l'évaluation des données, il convient d'utiliser la feuille Excel de calcul automatisé fournie avec le protocole DB-ALM. Des instructions précises figurent dans le protocole DB-ALM n° 217 (11).

21. Pour chaque durée d'incubation (d'exposition) « t », les paramètres suivants sont calculés :

- Moyenne arithmétique et écart type de l'intensité de la fluorescence des 12 témoins blanc (TB)
- Moyenne arithmétique et écart type de l'intensité de la fluorescence des 12 témoins véhicule (TV)
- Valeurs TV corrigées, obtenues en retranchant la moyenne TB des valeurs TV
- Valeur corrigée relative à chaque concentration de produit chimique d'essai et de TP, obtenue en retranchant la valeur du témoin produit chimique d'essai de la valeur obtenue correspondante.

22. La déplétion relative de peptide, en %, est calculée comme suit pour chaque concentration de produit chimique d'essai et chaque durée d'exposition :

$$\text{déplétion relative de peptide [\%]} = \left(1 - \frac{\text{valeur corrigée produit chimique d'essai ou TP}}{\text{moyenne des TV corrigés}}\right) \cdot 100\%$$

23. Pour chaque concentration de produit chimique d'essai, la moyenne arithmétique et l'écart type des trois réplicats sont calculés (par durée d'exposition). Un test t de Student est réalisé pour déterminer si les concentrations de peptide mesurées dans les trois réplicats sont plus basses de façon statistiquement significative que la concentration dans les 12 puits TV.

24. Dans le kDPRA, les constantes de vitesse de la réaction sont déterminées conformément aux instructions données plus loin si (i) une déplétion peptidique  $\geq 13.89\%$  est observée à la concentration la plus élevée du produit chimique d'essai (concentration finale du produit chimique d'essai 5 mM) à un instant donné et si (ii) la différence est statistiquement significative par rapport au TV. Ce « critère de positivité » est basé sur le critère « positif » pour la réactivité peptidique dans le modèle prédictif relatif à la cystéine seule du DPRA, décrit à l'Appendice I de la présente Ligne directrice. Si le critère de positivité n'est pas rempli, le produit chimique d'essai est considéré comme non réactif selon le modèle prédictif du paragraphe 28.

25. Le logarithme népérien des concentrations de peptide non déplété ( $100 - \text{déplétion relative de peptide (\%)}$ ) est représenté graphiquement en fonction de la concentration de produit chimique d'essai à chaque point dans le temps. Si une relation linéaire est observée (coefficient de corrélation  $> 0.90$ ), la pente de la courbe est déterminée. La valeur absolue de cette pente négative correspond à la constante de vitesse observée pour la réaction (constantes de vitesse du pseudo-premier ordre  $k_{\text{observées}}$  en  $\text{mM}^{-1}$ ). À partir de la valeur  $k_{\text{observée}}$  pour chaque durée d'exposition, la constante de vitesse de la réaction ( $k_t$ ) par concentration et durée d'incubation (d'exposition) « t » est calculée comme suit :

$$k_t [M^{-1}s^{-1}] = k_{\text{observée}} \cdot \frac{1000}{60 \cdot t}$$

où « t » est la durée d'exposition en minutes. Si l'on n'observe pas de relation linéaire (si le coefficient de corrélation est < 0.90), il convient de suivre les recommandations du paragraphe 27.ii.

26. Pour chaque durée d'exposition « t » pour laquelle la corrélation est > 0.90, le logarithme décimal ( $\log k_t$ ) est calculé et la valeur la plus élevée est définie comme  $\log k_{\max}$ .

### Critères d'acceptabilité

27. Les critères suivants doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide. Si un seul ou plusieurs de ces critères ne sont pas remplis, l'épreuve doit être répétée.

- a) TP : le  $\log k$  du TP à 90 min ( $\log k_{90 \text{ min}}$ ) doit être compris entre -1.75 et -1.40  $M^{-1}s^{-1}$ . Si aucun  $\log k_{90 \text{ min}}$  n'est obtenu, par exemple parce que la réactivité n'est pas encore statistiquement significative, la valeur à 150 min ( $\log k_{150 \text{ min}}$ ) peut être prise en compte, et doit se situer entre -1.90 et -1.45  $M^{-1}s^{-1}$ .
- b) TV : le coefficient de variance des 12 valeurs TV d'une plaque doit être < 12.5 % pour au moins 5 des 6 durées d'exposition.

28. Il convient en outre d'évaluer les données obtenues pour le produit chimique d'essai afin d'identifier les conditions éventuelles pouvant affecter les résultats :

- i. Interruption de l'évolution dans le temps : une déplétion significative observée aux premiers points dans le temps mais pas aux suivants dénote soit une réaction non linéaire inhérente au produit chimique d'essai, soit une variation expérimentale. L'épreuve doit être répétée. Si le même profil est reproductible, une cinétique non linéaire est démontrée et la constante de vitesse observée aux premiers points dans le temps est acceptée.
- ii. Relation concentration-réponse non linéaire : dans un petit nombre de cas, la relation concentration-réponse n'est pas linéaire, mais une déplétion claire est notée. Il n'est pas possible d'établir la constante de vitesse par la méthode de la pente, car le coefficient de régression est  $R^2 < 0.90$ . Les constantes de vitesse peuvent alors être calculées par une méthode alternative, en appliquant la formule suivante aux différentes valeurs de déplétion obtenues :

$$k = [\ln (100/(100 - dp))]/(E \times t)$$

où « dp » est la déplétion en %, « E » la concentration de produit chimique d'essai et « t » la durée d'incubation (d'exposition). Les constantes de vitesse sont calculées selon cette formule pour chaque temps « t » et chaque concentration « E » donnant des valeurs de déplétion supérieures au seuil de 13.89 %. Pour chaque temps « t », on prend la moyenne des valeurs obtenues aux différentes concentrations, et l'on note là encore le  $\log k_{\max}$  correspondant à la vitesse la plus élevée pour chaque point dans le temps.

Il convient dans ce cas de répéter l'épreuve pour vérifier si ce comportement non linéaire est inhérent au produit chimique d'essai ou si une variation expérimentale est en cause. Si la non-linéarité est reproductible, cette méthode de calcul alternative, basée sur les valeurs de déplétion individuelles, est utilisée pour le calcul final.

- iii. Interférence dans la mesure de fluorescence (autofluorescence ou extinction) : les puits témoins contenant le produit chimique d'essai seul, en l'absence du peptide d'essai, permettent de détecter l'incidence de l'autofluorescence ou de l'extinction de fluorescence dues au produit chimique

d'essai. Les valeurs étant corrigées de l'autofluorescence relevée dans les puits témoins pour le produit chimique d'essai, l'autofluorescence ne pose pas de problème lorsqu'elle est faible ; cependant, si elle est élevée, elle peut ne pas être totalement additive avec la fluorescence de l'adduit peptidique, auquel cas la soustraction de l'autofluorescence peut se traduire par une déplétion apparente due non pas à la perte de signal du peptide mais à cette non-additivité. Il importe donc de vérifier si la déplétion observée est dépendante du temps. Si ce n'est pas le cas et qu'une autofluorescence est observée, on considère qu'une déplétion liée à l'autofluorescence intervient. L'extinction de fluorescence peut, elle aussi, se traduire par une « pseudo-déplétion », mais elle surviendra immédiatement et la déplétion résultante n'augmentera pas dans le temps. Si ces deux conditions sont réunies, on considère qu'une déplétion liée à l'extinction intervient. De tels cas sont rares. Si les résultats ne sont pas clairs, l'épreuve peut être répétée, mais si l'effet est nettement identifiable, une répétition ne sera pas nécessaire. En pareil cas, le produit chimique d'essai ne peut pas être évalué par le kDPRA (limite technique), à moins que la réaction puisse être mesurée avec une autre sonde fluorescente n'induisant pas d'autofluorescence ou d'extinction (voir la Section II de l'Annexe 1 du protocole DB-ALM (11)).

- iv. Tous les cas mentionnés dans ce qui précède sont décrits en détails dans le protocole DB-ALM, et des alertes automatiques apparaissent, lors de l'évaluation des données, dans le modèle Excel fourni avec le protocole DB-ALM.

### Modèle prédictif

29. Le kDPRA utilise les vitesses de déplétion du peptide à cystéine pour distinguer les sensibilisants de la sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU de ceux qui ne sont pas sous-catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A) selon le SGH de l'ONU (3). Il convient d'interpréter les résultats obtenus avec cette méthode d'essai qui ne conduisent pas à une sous-catégorisation 1A dans le cadre des limites mentionnées au paragraphe 3 et à l'Annexe 1 du présent Appendice.

**Tableau 7. modèle prédictif du kDPRA**

Vitesse de réaction	Prédiction kDPRA
$\log k_{\max} \geq -2.0$	Sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU
Non réactif ou $\log k_{\max} < -2.0$	Non classé en sous-catégorie 1A* du SGH de l'ONU (non-sous-catégorie 1A)

\* Des informations complémentaires sont nécessaires pour discriminer 'Classé en sous-catégorie 1B du SGH de l'ONU' et 'Non classé selon le SGH de l'ONU'. En fonction du contexte (par exemple IATA ou DA), cette information peut être générée avant ou après avoir réalisé le kDPRA.

30. Dans les cas où un résultat  $\log k_{\max}$  est proche du seuil de -2.0 et se situe dans le domaine limite calculé pour le kDPRA (c'est-à-dire entre -1.93 et -2.06 (12)), on ne peut pas établir de prédiction définitive. Dans ce cas, un nouvel essai et/ou des données/informations complémentaires sont nécessaires pour parvenir à une prédiction définitive.

31. Il est également possible d'utiliser la constante de vitesse dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA ou DA afin d'évaluer la puissance de sensibilisation cutanée d'un produit chimique d'essai sur une échelle continue, pour les besoins de l'évaluation des risques (3) (10).

## Rapport d'essai

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

### ***Produit chimique d'essai et témoins (témoin positif et solvant/véhicule)***

*Pour toutes les substances mono-constituant (produit chimique d'essai et témoins)*

Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants

Propriétés physicochimiques : état physique, apparence, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés 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

*Informations complémentaires pour le témoin positif*

Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité de l'épreuve, s'il y a lieu.

*Informations complémentaires pour le témoin solvant/véhicule*

Solvant/véhicule utilisé et caractéristiques quantitatives des constituants, s'il y a lieu

Justification du choix d'un solvant autre que l'acétonitrile et évaluation expérimentale de l'effet du solvant sur la stabilité du peptide.

### ***Peptide***

Fournisseur, lot, pureté

### ***Analyse de fluorescence***

Fluorimètre utilisé (modèle, type, notamment) et réglage des longueurs d'onde.

## *Épreuves de compétence*

Attestation selon laquelle l'établissement responsable du test a démontré sa compétence dans l'utilisation de la méthode d'essai en testant les substances d'épreuve de compétence, avant une application de la méthode d'essai en routine.

## *Discussion des résultats*

Description de toutes modifications non prévues apportées au mode opératoire

Discussion des résultats obtenus avec la méthode d'essai kDPRA, en précisant s'ils se situent dans les plages de valeurs spécifiées au paragraphe 29

Description de toute observation pertinente relative par exemple à l'apparition d'un précipité dans le mélange de réaction à la fin du temps d'incubation, en précisant si le précipité a été resolubilisé ou centrifugé

## *Conclusion*

### Référence de l'appendice III

- Wareing, B., Urbisch, D., Kolle, S. N., Honarvar, N., Sauer, U. G., Mehling, A. and Landsiedel, R., (2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data. *Toxicol In Vitro* 45, 134-145.
- Roberts, D. W. and Natsch, A., (2009) High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 592-603.
- Natsch, A., Haupt, T., Wareing, B., Landsiedel, R., and Kolle, S.N., (2020) Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency assessment and subclassification. *ALTEX*, 37(4), 652-664
- Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaar, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A., (2020) The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial. *ALTEX*, 37(4), 639-651, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D., Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*, 2018. 48(5): p. 344-358.
- Basketter, D. A., Alepee, 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. and Templier, M., (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- International ad hoc Expert Panel, (2020) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) as a modified version of the DPRA assay according to OECD TG 442C, to extend its regulatory applicability to identify UN GHS Subcategory 1A.
- S. Casati, K. A., B.D. Asturiol, D. Basketter, S. Dimitrov, C. Dumont, A.T. Karlberg, J. P. Lepoittevin, G. Patlewicz, D. Roberts, A. Worth, (2016) Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. Available at:

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479><http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479>, last accessed 27.05.206.

Urbisch, D., Becker, M., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Teubner, W., Wareing, B. and Landsiedel, R., (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.

Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T. and 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, 319-32.

DB-ALM Protocol 217: The kinetic Direct Peptide Reactivity assay (kDPRA). Accessible at [http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM\\_docs/217\\_P\\_kDPRA\\_final\\_27Oct20.pdf](http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf).

Manuscript in preparation: Borderline ranges for *in chemico* and *in vitro* skin sensitization OECD test guideline methods determined from ring trials

ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. 2011. NIH Publication 11-7709.

ECETOC, ECETOC Document No. 46: Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. 2008.

OECD (2021), Validation report: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 337. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

OECD (2021), Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 338. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

APPENDICE III, ANNEXE 1

Limites connues de l'essai cinétique de liaison directe sur la réactivité peptidique (kDPRA))

Le tableau suivant résume les limites connues du kDPRA.

Classe de substances / interférence	Cause de sous-estimation ou d'interférence potentielle	Interprétation des données	Exemple de substance
Métaux et composés inorganiques	Connus pour réagir avec les protéines via des mécanismes autres que la liaison covalente	L'essai n'est pas applicable	Sulfate de nickel ; 7786-81-4
Hydroquinones, catéchols et amines aromatiques	Le temps de latence lié à l'oxydation peut réduire la vitesse de réaction apparente	Si $\log k_{\max} < -2.0$ , le résultat ne peut être accepté que si une faible réactivité est confirmée après l'oxydation	Paraphénylènediamine ; 106-50-3 ; 1A données humaines et ELGL
Halogénures d'acyle, esters phénoliques	Le produit chimique d'essai peut être spécifiquement réactif au groupe amine	Si $\log k_{\max} < -2.0$ mais que le produit chimique provoque spécifiquement une déplétion des groupes $\text{NH}_2$ mais pas des groupes SH dans le DPRA ou l'ADRA, le résultat n'est pas concluant	Dihydrocoumarine, 119-84-6 ; 1B ELGL ; données humaines n.d.
Aldéhydes	Le produit chimique d'essai peut être spécifiquement réactif au groupe amine	Si $\log k_{\max} < -2.0$ mais que le produit chimique provoque spécifiquement une déplétion des groupes $\text{NH}_2$ mais pas des groupes SH dans le DPRA ou l'ADRA, le résultat n'est pas concluant	Glutaraldéhyde ; 111-30-8 ; 1A données humaines et ELGL
Thiols ou produits chimiques libérant des thiols	Les produits chimiques d'essai comportant des groupes SH primaires ou se décomposant dans les conditions de l'essai peuvent réagir avec la sonde de détection	Le produit chimique d'essai ne peut pas être testé par le kDPRA avec dérivatisation par sonde réactive aux thiols ; il peut être nécessaire de générer d'autres données cinétiques avec le peptide d'essai, par CLHP, par exemple (non décrit dans cette Ligne directrice)	Thioglycérol ; 96-27-5 ; 1B ELGL ; données humaines n.d.
Pro-haptènes	Produits chimiques d'essai dont il est démontré qu'ils requièrent strictement une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée	Les pro-haptènes stricts peuvent être sous-évalués. Toutefois, les produits chimiques qui sont à la fois i) des pro-haptènes stricts (n'agissant pas aussi comme des haptènes directs ou des pré-haptènes) et ii) des allergènes forts semblent rares	Diéthylènetriamine ; 111-40-0 (1A données humaines, ELGL n.d.)
Produits chimiques fluorescents excités dans la plage de la sonde fluorescente	Si les fluorescences du produit chimique d'essai et de l'adduit mBrB-peptide ne sont pas additives, une pseudo-déplétion est observée	Suivre les indications du protocole DB-ALM n° 217 pour évaluer l'interférence avec l'essai	Tétrachlorosalicylanilide ; 1154-59-2 ; 1A données humaines et ELGL
Produits chimiques absorbants dans la plage d'émission de la sonde	Si le produit chimique d'essai éteint l'émission de fluorescence de l'adduit mBrB-peptide, une pseudo-déplétion est observée	Suivre les indications du protocole DB-ALM n° 217 pour évaluer l'interférence avec l'essai	Vanilline, 121-33-5 ; NC ELGL, données humaines n.d.

Mélanges et substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matériels biologiques	Aucune information n'a été publiée dans la littérature sur l'applicabilité du kDPRA	n.d.	n.d.
---	---	------	------

## APPENDICE III, ANNEXE 2

## SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in chemico* : essai cinétique de liaison directe sur la réactivité peptidique (kDPRA))

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans le présent Appendice, les laboratoires doivent démontrer leur compétence technique en obtenant, pour au moins 8 des 9 substances d'épreuve de compétence recommandées au Tableau 1, les prédictions attendues de la méthode kDPRA et en obtenant, pour 7 des 9 substances d'épreuve de compétence, des constantes de vitesse  $\log k_{\max}$  de la cystéine situées dans le domaine de référence applicable. Les substances d'épreuve ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles pour le danger et la puissance de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection ont été la disponibilité des substances dans le commerce, la disponibilité de données de référence *in vivo* de haute qualité et de données *in vitro* de haute qualité obtenues avec le kDPRA, et le fait que les substances ont été utilisées dans l'étude de validation coordonnée par l'industrie visant à démontrer la bonne mise en œuvre de la méthode d'essai dans les laboratoires participant à l'étude.

**Tableau 8. substances d'épreuve de compétence recommandées pour démontrer la compétence technique des laboratoires s'agissant de l'essai cinétique de liaison directe sur la réactivité peptidique**

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> <sup>1</sup>	Catégorie SGH ONU ELGL	Catégorie SGH ONU données humaines	Prédiction kDPRA <sup>2</sup>	Intervalle de variation de $\log k_{\max}$ <sup>2</sup>
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	1A	1A	1A	(-0.8) – (-0.4)
Méthylisothiazolinone	2682-20-4	Solide	Sensibilisant (extrême)	1A	1A	1A	(-0.5) – (-0.1)
Oxazolone	15646-46-5	Solide	Sensibilisant (extrême)	1A	Pas de données	1A	(-0.3) – (0.0)
Méthyl-2-octynoate	111-12-6	Liquide	Sensibilisant (fort)	1A	1A	1A	(-1.6) – (-1.2)
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquide	Sensibilisant (faible)	1B	Pas de données	non-1A (1B ou NC)	(-3.2) – (-2.1)
Dihydrocoumarine	119-84-6	Liquide	Sensibilisant (faible)	1B	1B	non-1A (1B ou NC)	Non réactif
Diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA)	97-90-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	1B	1B	non-1A (1B ou NC)	(-2.8) – (-2.1)
4-Méthoxyacétophénone	100-06-1	Solide	Non sensibilisant	Non classé <sup>3</sup>	Non classé <sup>3</sup>	non-1A (1B ou NC)	Non réactif
Chlorobenzène	108-90-7	Liquide	Non sensibilisant	Non classé <sup>3</sup>	Non classé <sup>3</sup>	non-1A (1B ou NC)	Non réactif

<sup>1</sup> Les prédictions *in vivo* de danger et de puissance sont fondées sur des données ELGL (13). La puissance *in vivo* est déterminée à partir de critères proposés par l'ECETOC (14).

<sup>2</sup> Intervalles arrondis déterminés sur la base d'au moins 14 valeurs de  $\log k_{\max}$  établies par 7 laboratoires indépendants.

<sup>3</sup> Non sensibilisants selon le SGH de l'ONU.