



Section 4
Effets sur la santé

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

Essai de sensibilisation cutanée in vitro portant sur l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables pour la sensibilisation cutanée

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

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

INTRODUCTION GENERALE

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

1. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH) (1). Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, Adverse Outcome Pathway) (2) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la dermatite de contact allergique, en passant par les étapes intermédiaires. 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 sur cet 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 (DC), habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule, les transcriptions génomiques, les chimiokines et les cytokines. Le quatrième événement clé est la prolifération et l'activation des lymphocytes T, évaluée indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (3).

2. La présente ligne directrice (LD) décrit les essais in vitro portant sur les mécanismes de l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans l'AOP sensibilisation cutanée (2). La LD comprend des méthodes d'essai utilisées pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH de l'ONU (1).

Les méthodes décrites dans la présente LD sont les suivantes :

- test d'activation de la lignée cellulaire humaine (h-CLAT),
- test d'activation de la lignée cellulaire U937 (U-SENS™)
- essai par gène rapporteur de l'interleukine 8 (essai IL 8 Luc)

- détection génomique rapide des allergènes (GARD™) pour l'évaluation des sensibilisants cutanés (GARD™skin)

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

4. Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques qui utilisent un cobaye – le test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et le test de Buehler (LD 406) (4) – portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Les essais chez la souris – l'ELGL (LD 429) (3) et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA (LD 442A) (5) et l'ELGL : BrdU-ELISA (LD 442B) (6) – tous trois portant sur la réponse à l'induction exclusivement, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

5. Des méthodes d'essai de type mécanistique ont été adoptées afin d'aider à évaluer le potentiel de sensibilisation des produits chimiques. Il s'agit de méthodes in chemico (LD 442C de l'OCDE ; essai de liaison directe sur la réactivité peptidique portant sur le premier événement clé de l'AOP de la sensibilisation cutanée) (7) et in vitro (LD 442D de l'OCDE portant sur le deuxième événement de l'AOP de la sensibilisation cutanée) (8).

6. Il a été signalé que les sensibilisants cutanés induisent l'expression de marqueurs membranaires associés à l'activation des DC (2) tels que CD40, CD54, CD80, CD83 et CD86, induisent aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β et TNF- α , ainsi que plusieurs chimiokines parmi lesquelles IL 8 (CXCL8) et CCL3 (9) (10) (11) (12). Les méthodes décrites dans la présente LD permettent de quantifier soit les variations d'expression de marqueurs de surface associés au processus d'activation des monocytes et des DC suite à l'exposition à un sensibilisant (CD54 et CD86, par exemple), soit les changements d'expression de l'IL 8, une cytokine associée à l'activation des DC, soit une série de gènes (signature de marqueurs génomiques) qui sont associés avec le processus d'activation des monocytes et des cellules dendritiques faisant suite à l'exposition à des sensibilisants.

1. Cependant, l'activation des DC n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée (2) (13), les informations fournies par les méthodes d'essai mesurant uniquement les marqueurs de l'activation des DC peuvent ne pas suffire à elles seules pour conclure à l'absence de pouvoir de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Par conséquent, les données obtenues avec les méthodes d'essai décrites dans la présente LD peuvent apporter une aide à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA), en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais in vitro portant sur d'autres phases de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que les méthodes in silico et la prévision à partir de données croisées (read-across) relatives à des produits chimiques similaires (13). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données obtenues avec ces méthodes suivant des approches définies, c'est-à-dire des approches normalisées au regard des sources d'information et des procédures d'analyse des données à des fins de prédictions (13). Ces données peuvent constituer des sources d'information mises en œuvre dans des Lignes directrices sur des approches définies sur la sensibilisation cutanée. 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 tout autre procédure d'interprétation des données (14). Pour plus de détails sur l'application des plages de valeurs limites, il faut se référer à la Figure 1 de l'Annexe I.

2. 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 le LD 497 quelles sont les méthodes/combinaisons de méthodes à utiliser.

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

9. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé et ne fait pas référence à l'applicabilité des méthodes pour tester les substances mono-constituants, les substances multi-constituants ou les mélanges. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité des méthodes d'essai à des substances multi-constituants ou à des mélanges (15) (16). Les méthodes sont néanmoins techniquement applicables aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques et substances difficiles à tester (parce qu'instable par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables. De plus, en cas d'essai portant sur des substances multi-constituants ou des mélanges, il convient de tenir compte de l'interférence possible de la cytotoxicité des constituants avec les réponses observées.

BIBLIOGRAPHIE

1. United Nations UN (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html].
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. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
3. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
4. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

6. OECD (2010), Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
7. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
8. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
9. Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
10. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
11. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
12. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.
13. 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>].
14. OECD. (2023). Guideline No. 497: Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
16. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

ANNEXE I : SENSIBILISATION CUTANÉE IN VITRO : TEST D'ACTIVATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE HUMAINE (H-CLAT)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. La méthode d'essai h-CLAT permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs de surface cellulaires associés au processus d'activation des monocytes et des cellules dendritiques (DC) (CD86 et CD54), dans la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP-1, à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1) (2). Le niveau d'expression mesuré pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54 est utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.

2. La méthode d'essai h-CLAT a fait l'objet d'une étude de validation coordonnée 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) de EURL ECVAM. Après analyse des données disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'EURL ECVAM a recommandé l'utilisation de la méthode h-CLAT (3) dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données h-CLAT combinées à d'autres sources d'information (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Il a été démontré que la méthode h-CLAT est transférable à des laboratoires expérimentés dans les techniques de cultures cellulaires et de l'analyse par cytométrie en flux. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par la méthode d'essai est de l'ordre de 80 % intra-laboratoire et 80 % inter-laboratoires (3) (12). L'étude de validation (13) et d'autres études publiées (14) ont permis de conclure que, par rapport aux résultats obtenus par la méthode ELGL, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) et non-sensibilisants est de 85 % (N = 142), avec une sensibilité de 93 % (94/101) et une spécificité de 66 % (27/41) (d'après une nouvelle analyse de l'EURL ECVAM (12) prenant en compte toutes les données existantes mais excluant les résultats négatifs obtenus avec un coefficient de partage octanol-eau (log K_{ow}) supérieur à 3.5 tel que décrit au paragraphe 4). Il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec la méthode h-CLAT concernent davantage des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH) que des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (c'est-à-dire sous-catégorie 1A) (4) (13) (15). L'ensemble de ces données montre l'utilité de la méthode h-CLAT comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode d'essai h-CLAT utilisée seule 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, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction Générale. En outre, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode h-CLAT est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes réactionnels, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études in vivo) et propriétés physico-chimiques (3) (14) (15). La méthode h-CLAT est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant/véhicule en formant plusieurs phases) dans un solvant/véhicule adapté (voir paragraphe 14). Les résultats pour les produits chimiques présentant un log Koe supérieur à 3.5 sont souvent des faux négatifs (14). Par conséquent, les résultats négatifs associés à des produits chimiques présentant un log Koe supérieur égal à 3.5 ne doivent pas être considérés. Cependant les résultats positifs associés à des produits chimiques présentant un log Koe supérieur égal à 3.5 peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (16) ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (substances activées par oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs avec le h-CLAT (15). Il est possible de tester des produits chimiques fluorescents avec le h-CLAT (17), néanmoins les produits fortement fluorescents qui émettent à la même longueur d'onde que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou que l'iodure de propidium (IP) causent une interférence avec la détection par cytométrie en flux. Ces produits ne peuvent donc pas être adéquatement analysés avec des anticorps conjugués au FITC ou à l'IP. Dans ce cas, on peut recourir respectivement au marquage des anticorps par d'autres fluorochromes, ou à d'autres marqueurs de cytotoxicité, à condition qu'il soit démontré, par exemple en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice II, que ces techniques génèrent des résultats similaires aux anticorps marqués au FITC (voir paragraphe 24) ou à l'IP (voir paragraphe 18). À la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et combinés avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. S'il est démontré que la méthode h-CLAT n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

5. Comme indiqué ci-dessus, la méthode h-CLAT aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA ou Approche définie (AD) (14), elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (4) (5) (9). Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats du h-CLAT pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation.

6. Les définitions sont données à l'appendice I.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La méthode in vitro h-CLAT permet de quantifier les variations d'expression de marqueurs de surface (CD86 et CD54) des cellules de la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP-1, après une exposition de 24 heures à un produit chimique d'essai. Ces molécules de surface sont des marqueurs

typiques de l'activation des monocytes THP-1 et peuvent imiter l'activation des DC, étape critique dans l'amorçage des lymphocytes T. La variation d'expression des marqueurs de surface est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps marqués par fluorochrome. La cytotoxicité est mesurée en parallèle pour savoir si l'activation de l'expression des marqueurs de surface a lieu à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité. L'intensité relative de fluorescence des marqueurs de surface, comparée à celle du témoin de solvant/véhicule, est calculée et utilisée dans un modèle prédictif (voir paragraphe 26), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

8. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente annexe de la Ligne directrice 442E, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'appendice II. En outre, les utilisateurs de la méthode devront conserver une base de données historiques issues des contrôles de réactivité (voir paragraphe 11) et obtenues avec le témoin positif et le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 20-22), et devront utiliser ces données pour confirmer que la reproductibilité de la méthode d'essai au sein de leur laboratoire est maintenue au cours du temps.

MODE OPÉRATOIRE

9. La présente méthode d'essai est basée sur le protocole h-CLAT du service de base de données sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (DB-ALM, DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation n° 158) (18), qui est celui qui a été 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 h-CLAT au laboratoire. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode h-CLAT, qui comprend deux étapes : un essai de détermination de la dose et la mesure de l'expression de CD86/CD54.

Préparation des cellules

10. La méthode h-CLAT fait appel à la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine, THP-1. Il est recommandé d'acquérir les cellules (TIB-202™) auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple l'American Type Culture Collection.

11. Les cellules THP-1 sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO₂, dans un milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (SBF), 0.05 mM de 2-mercaptoéthanol, 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Il est possible d'éviter l'ajout de pénicilline et de streptomycine dans le milieu. Cependant, dans ce cas, les utilisateurs devront vérifier que l'absence d'antibiotiques dans le milieu n'a aucun effet sur les résultats, par exemple en testant les substances d'épreuve indiquées à l'appendice II. Quoi qu'il en soit, dans le but de minimiser le risque de contamination, les bonnes pratiques de culture cellulaire seront suivies, indépendamment de la présence ou non d'antibiotiques dans le milieu de culture cellulaire. Les cellules THP-1 sont repiquées régulièrement tous les 2 ou 3 jours, à une densité comprise entre 0.1 et 0.2 x 10⁶ cellules/mL, et doivent être maintenues à une densité comprise entre 0.1 et 1 x 10⁶ cellules/mL. Avant utilisation pour l'essai, les cellules doivent être qualifiées par un contrôle de réactivité. Ce contrôle doit être réalisé deux semaines après la décongélation, avec pour témoins positifs le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) (N° CAS 97-00-7, pureté ≥ 99 %) et le sulfate de nickel (NiSO₄) (N° CAS 10101-97-0, pureté ≥ 99 %) et pour témoin négatif l'acide

lactique (AL) (N° CAS 50-21-5, pureté ≥ 85 %). Le DNCB et le NiSO₄ doivent tous deux générer des réponses positives à la fois pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54. L'acide lactique doit générer une réponse négative à la fois pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54. Seules les cellules ayant réussi le contrôle de réactivité sont utilisées pour l'essai. Les cellules peuvent être repiquées jusqu'à deux mois après décongélation, sans dépasser 30 repiquages. Le contrôle de réactivité doit être conduit selon les procédures décrites aux paragraphes 20-24.

12. Pour l'essai, les cellules THP-1 sontensemencées à une densité de 0.1 x 10⁶ cellules/mL ou de 0.2 x 10⁶ cellules/mL, et pré-cultivées dans des flacons de culture pendant 72 h ou 48 h, respectivement. Il est important que la densité cellulaire dans le flacon de culture immédiatement après la période de pré-culture soit autant que possible la même dans chaque expérimentation (en suivant l'une des deux conditions de pré-culture ci-dessus). En effet, la densité cellulaire dans le flacon de culture immédiatement après la pré-culture peut influencer l'expression de CD86/CD54 induite par des allergènes (19). Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et suspendues à une densité de 2 x 10⁶ cellules/mL dans un milieu frais. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une plaque microtitre 24 puits à fond plat, avec 500 μ L (1 x 10⁶ cellules/puits), ou dans une plaque 96 puits à fond plat, avec 80 μ L (1.6 x 10⁵ cellules/puits).

Essai de détermination de la dose

13. Un essai de détermination de la dose est mené pour établir la valeur CV75, à savoir la concentration de produit chimique d'essai provoquant une viabilité cellulaire (CV) de 75 % comparé au témoin de solvant/véhicule. Cette valeur CV75 est utilisée pour déterminer la concentration de produits chimiques d'essai à utiliser lors de la mesure d'expression de CD86/CD54 (voir paragraphes 20-24).

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

14. Les produits chimiques d'essai et les substances témoins sont préparés le jour de l'essai. Dans la méthode h-CLAT, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable (voir paragraphe 4), en choisissant de préférence comme solvant/véhicule une solution saline ou le milieu, ou, en deuxième option, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, pureté ≥ 99 %) si le produit chimique d'essai n'est pas soluble ou ne forme pas une dispersion stable dans les deux solvants/véhicules précédents. Les concentrations finales sont de 100 mg/mL (solution saline ou milieu) ou de 500 mg/mL (DMSO). Il est possible d'utiliser d'autres solvants/véhicules que ceux indiqués ci-dessus, à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. La stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule final doit être prise en compte.

15. À partir des solutions mères de produits chimiques d'essai, à 100 mg/mL (solution saline ou milieu) ou à 500 mg/mL (DMSO), les dilutions suivantes sont effectuées :

- si le solvant/véhicule est la solution saline ou le milieu : huit solutions mères (huit concentrations) sont préparées par une série de dilutions de facteur 2 en utilisant le solvant/véhicule pertinent. Ces solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 50 dans le milieu de culture (solutions de travail). Si la concentration finale maximale de 1 000 μ g/mL dans la plaque n'est pas toxique, la concentration maximale doit être à nouveau déterminée en réalisant un autre essai de cytotoxicité. La concentration finale dans la plaque ne doit pas dépasser 5 000 μ g/mL pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans la solution saline ou le milieu ;
- si le solvant/véhicule est le DMSO : huit solutions mères (huit concentrations) sont préparées par une série de dilutions de facteur 2 en utilisant le solvant/véhicule pertinent. Ces solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 250 dans le milieu de culture (solutions de

travail). La concentration finale dans la plaque ne doit pas dépasser 1000 µg/mL, même si cette concentration est non-toxique.

Les solutions de travail sont enfin utilisées pour l'exposition, en ajoutant le même volume de solution de travail au volume de cellules THP-1 en suspension dans la plaque (voir aussi paragraphe 17), pour parvenir à une dilution supplémentaire de facteur 2 (en général, les concentrations finales dans la plaque vont de 7.81 à 1 000 µg/mL).

16. Le témoin de solvant/véhicule utilisé pour la méthode h-CLAT est le milieu de culture (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable (voir paragraphe 4) dans le milieu ou dans la solution saline), ou le DMSO (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le DMSO). Ce témoin est testé à une concentration finale unique de 0.2 % dans la plaque. On effectue la même dilution que pour les solutions de travail, comme décrit au paragraphe 15.

Application des produits chimiques d'essai et des témoins

17. Le milieu de culture ou les solutions de travail décrits aux paragraphes 15 et 16 sont mélangés en proportion 1:1 (v/v) avec les suspensions de cellules préparées dans la plaque microtitre 24 ou 96 puits à fond plat (voir paragraphe 12). Les plaques traitées sont ensuite placées en incubation pendant 24 ± 0.5 heures à 37 °C, 5 % CO₂. Des précautions doivent être prises contre l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles et pour éviter toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple) (20).

Coloration à l'iodure de propidium (IP)

18. Après 24 ± 0.5 heures d'exposition, les cellules sont transférées dans des tubes à essai et collectées par centrifugation. Les surnageants sont éliminés et le culot cellulaire est suspendu dans 200 µL (plaque 96 puits) ou 600 µL (plaque 24 puits) de tampon phosphate salin contenant 0.1 % d'albumine de sérum bovin (tampon de coloration). On transfère 200 µL de suspension de cellules dans une plaque microtitre 96 puits à fond rond (échantillons issus de la plaque 96 puits) ou dans un microtube (échantillons issus de la plaque 24 puits), puis les cellules sont rincées deux fois dans 200 µL (96 puits) ou 600 µL (24 puits) de tampon de coloration. Pour finir, les cellules sont remises en suspension dans le tampon de coloration (400 µL, par exemple) et on ajoute une solution d'IP (20 µL, par exemple) (pour obtenir, par exemple, une concentration finale d'IP de 0.625 µg/mL). D'autres marqueurs de cytotoxicité tels que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou le bleu de Trypan, entre autres, peuvent être utilisés comme colorants s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables à l'IP, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice II.

Mesure de cytotoxicité par cytométrie en flux et estimation de la valeur CV75

19. Le niveau de fixation de l'IP est analysé par cytométrie en flux sur le canal FL 3. Au total, 10 000 cellules vivantes (IP négatives) sont analysées. La viabilité cellulaire est calculée par le programme d'analyse du cytomètre suivant l'équation ci-après. Si la viabilité cellulaire est faible, il convient d'analyser jusqu'à 30 000 cellules, y compris des cellules mortes. Une autre option est d'acquérir les données pendant une minute après le début de l'analyse.

$$\text{Viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total de cellules analysées}} \times 100$$

La valeur CV75 (voir paragraphe 13), soit la concentration provoquant 25 % de cytotoxicité et 75 % de survie des cellules THP-1, est calculée par interpolation log-linéaire des données, comme suit :

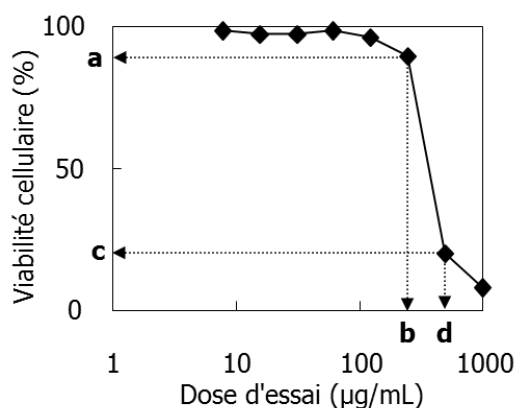
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

Où :

a est la valeur minimale de viabilité cellulaire supérieure à 75 %

c est la valeur maximale de viabilité cellulaire inférieure à 75 %

b et d sont les concentrations provoquant les valeurs de viabilité cellulaire a et c, respectivement



D'autres approches pour calculer la valeur CV75 peuvent être utilisées à condition qu'il soit démontré que cela n'a pas d'impact sur les résultats (par exemple en testant les substances d'épreuve).

Mesure de l'expression de CD86/CD54

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

20. Le solvant/véhicule approprié (solution saline, milieu ou DMSO, voir paragraphe 14) est utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai ou pour créer une dispersion stable. Les produits chimiques d'essai sont d'abord dilués jusqu'à une concentration correspondant à 100 fois (dans la solution saline ou le milieu) ou 500 fois (dans le DMSO) la valeur CV75 x 1.2 telle que déterminée dans l'essai de

détermination de la dose (voir paragraphe 19). Si la valeur CV75 ne peut pas être établie (c'est-à-dire, si la cytotoxicité observée dans l'essai de détermination de la dose est insuffisante), il convient d'utiliser comme concentration de départ la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée du produit chimique d'essai préparé avec chaque solvant/véhicule. On notera que la concentration finale dans la plaque microtitre ne doit pas dépasser 5 000 µg/mL (dans la solution saline ou le milieu) ou 1 000 µg/mL (dans le DMSO). Ensuite, des dilutions en série de facteur 1.2 sont réalisées avec le solvant/véhicule pertinent pour obtenir les solutions mères (huit concentrations allant de $100 \times 1.2 \times \text{CV75}$ à $100 \times 0.335 \times \text{CV75}$ (dans la solution saline ou le milieu) ou de $500 \times 1.2 \times \text{CV75}$ à $500 \times 0.335 \times \text{CV75}$ (pour le DMSO)) qui seront testées suivant la méthode h-CLAT (voir le protocole DB-ALM n° 158 pour un exemple de schéma de dosage). Les solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 50 (solution saline ou milieu) ou 250 (DMSO) dans le milieu de culture (solutions de travail). Ces solutions de travail sont enfin utilisées pour l'exposition, après une dilution finale de facteur 2 dans la plaque microtitre. Si les résultats ne rentrent pas dans les critères d'acceptabilité pour la viabilité cellulaire décrits aux paragraphes 29 et 30, l'essai de détermination de la dose peut être répété pour déduire une valeur CV75 plus précise. Il convient de noter que seules des plaques 24 puits peuvent être utilisées pour la mesure de l'expression de CD86/CD54.

21. Le témoin de solvant/véhicule est préparé comme indiqué au paragraphe 16. Le témoin positif utilisé dans la méthode h-CLAT est le DNCB (voir paragraphe 11), dont des solutions mères sont préparées dans le DMSO et diluées comme pour les solutions mères au paragraphe 20. Le DNCB doit être utilisé comme témoin positif pour la mesure de l'expression de CD86/CD54 à une concentration finale unique dans la plaque (en général 4.0 µg/mL). Pour obtenir une concentration de 4.0 µg/mL de DNCB dans la plaque microtitre, une solution de base de 2 mg/mL de DNCB dans le DMSO est préparée puis diluée à nouveau par un facteur de 250 dans le milieu, jusqu'à obtenir une solution de travail à 8 µg/mL. Il est aussi possible de prendre la valeur CV75 du DNCB, déterminée dans chaque installation d'essai, comme concentration du témoin positif. D'autres témoins positifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves. Pour les témoins positifs, la concentration finale unique dans la plaque ne doit pas dépasser 5 000 µg/mL (solution saline ou milieu) ou 1 000 µg/mL (DMSO). Les critères d'acceptabilité de l'épreuve sont identiques à ceux décrits pour les produits chimiques d'essai (voir paragraphe 29), sauf le dernier critère d'acceptabilité puisque le témoin positif est traité à une concentration unique.

Application des produits chimiques d'essai et des témoins

22. Une expérience par produit chimique d'essai et par substance témoin est nécessaire pour obtenir une prédiction. Chaque expérience consiste en au moins deux épreuves indépendantes visant à mesurer l'expression de CD86/CD54 (voir paragraphes 26-28). Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour en respectant les conditions suivantes pour chaque épreuve : a) préparation de solutions mères et de travail fraîches, indépendantes, du produit chimique et des solutions d'anticorps, et b) utilisation de cellules récoltées en deux temps indépendants (provenant de flacons de culture différents) ; les cellules peuvent cependant être issues d'un même repiquage. Les solutions de travail des produits chimiques d'essai et des substances témoins (500 µL) sont mélangées à 500 µL de la suspension de cellules (1×10^6 cellules) suivant un ratio 1:1. Les cellules sont incubées pendant 24 ± 0.5 heures comme décrit aux paragraphes 20 et 21. Pour chaque épreuve, un seul réplicat par concentration du produit chimique d'essai et de la substance témoin suffit, car la prédiction provient d'au moins deux épreuves indépendantes.

Coloration cellulaire et analyse

23. Après 24±0.5 heures d'exposition, les cellules sont transférées de la plaque 24 puits vers des tubes à essai et collectées par centrifugation, avant d'être lavées deux fois avec 1mL de tampon de coloration (si nécessaire, des étapes de lavage supplémentaires peuvent être faites). Après lavage, les cellules sont saturées avec 600 µL de solution de blocage (tampon de coloration contenant 0.01 % (w/v) de globuline (fraction Cohn II, III, humain : SIGMA, #G2388-10G)) et incubées à 4°C pendant 15 minutes. Après la saturation, les cellules sont réparties en trois aliquotes de 180 µL, dans une plaque 96 puits à fond rond ou dans un microtube.

24. Après centrifugation, les cellules sont colorées à 4°C pendant 30 minutes, avec 50 µL d'anticorps marqués au FITC : anti-CD86 ou anti-CD54, ou anticorps murins isotype IgG1. Les anticorps, décrits dans le protocole n° 158 (h-CLAT) de la base de données DB-ALM (18), sont dilués dans du tampon de coloration selon un ratio de 3:25 (v/v, pour CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)) ou 3:50 (v/v, pour CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) et IgG1 (DAKO, #X0927)). Ces ratios de dilution des anticorps ont été identifiés au moment de la mise au point de la méthode comme ceux présentant le meilleur rapport signal/bruit. L'expérience acquise lors de la mise au point de la méthode d'essai indique que l'intensité de la fluorescence des anticorps est généralement comparable d'un lot à un autre. Cependant, les utilisateurs peuvent souhaiter procéder au titrage des anticorps dans leurs conditions de laboratoire, afin de déterminer la concentration la mieux adaptée. Des anticorps anti-CD86 et/ou anti-CD54 marqués par d'autres fluorochromes peuvent être utilisés s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables aux anticorps marqués au FITC, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice II. Il convient de noter qu'un changement de clone ou de fournisseur d'anticorps, comme décrit dans le protocole n° 158 (h-CLAT) de la base de données DB-ALM (18), peut avoir un impact sur les résultats. Après avoir été lavées deux fois ou plus dans 150 µL de tampon de coloration, les cellules sont remises en suspension dans du tampon de coloration (p.ex. 400 µL) et on ajoute la solution d'IP (p.ex. 20 µL, pour une concentration finale de 0.625 µg/mL) ou un autre marqueur de cytotoxicité (voir paragraphe 18). Le niveau d'expression de CD86 et CD54, ainsi que la viabilité cellulaire, sont analysés par cytométrie en flux.

RÉSULTATS ET RAPPORT***Évaluation des données***

25. Le niveau d'expression de CD86 et CD54 est analysé par cytométrie en flux sur le canal FL 1. En fonction de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF, intensité moyenne de fluorescence), l'intensité relative de fluorescence (IRF) de CD86 et de CD54 pour les cellules témoins (ctrl) positives et pour les cellules exposées au produit chimique est calculée comme suit :

$$\text{IRF} = \frac{\text{IMF cellules exposées au produit chimique} - \text{IMF témoins isotypes exposés au produit chimique}}{\text{IMF témoins exposés au solvant/véhicule} - \text{IMF témoins isotypes exposés au solvant/véhicule}} \times 100$$

La viabilité cellulaire des cellules témoins isotypes, colorées avec les anticorps murins IgG1 (isotypes) est aussi calculée, suivant l'équation indiquée au paragraphe 19.

Modèle prédictif

26. Pour la mesure de l'expression de CD86/CD54, on teste chaque produit chimique d'essai dans au moins deux épreuves indépendantes pour en déduire une prédiction unique (POSITIVE ou NÉGATIVE). Une prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE si l'une au moins des conditions suivantes se réalise dans deux sur deux ou au moins deux sur trois épreuves indépendantes ; dans le cas contraire, la prédiction est jugée NÉGATIVE (figure 1) :

- IRF de CD86 \geq 150 % à au moins une concentration testée (et viabilité cellulaire \geq 50 %) ;
- IRF de CD54 \geq 200 % à au moins une concentration testée (et viabilité cellulaire \geq 50 %).

27. En se basant sur les critères ci-dessus, si les deux premières épreuves sont toutes deux positives pour CD86 et/ou toutes deux positives pour CD54, la prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. De même, si les deux premières épreuves sont toutes deux négatives pour les deux marqueurs, la prédiction par h-CLAT est jugée NÉGATIVE (compte tenu des dispositions prévues au paragraphe 30) et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Cependant, si les deux premières épreuves ne sont pas concordantes pour l'un des marqueurs au moins (CD54 ou CD86), il est nécessaire de réaliser une troisième épreuve et la prédiction sera fondée sur le résultat obtenu dans la majorité des trois épreuves individuelles (c'est-à-dire 2 sur 3). À ce sujet, on notera que, si deux épreuves indépendantes sont menées et que l'une n'est positive que pour CD86 tandis que l'autre n'est positive que pour CD54, il est nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Si la troisième épreuve est négative pour les deux marqueurs (ci-après N), la prédiction par h-CLAT est jugée NÉGATIVE. À l'inverse, si la troisième épreuve est positive pour l'un des marqueurs ou pour les deux marqueurs, la prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE.

28. Éventuellement, pour les produits chimiques d'essai assortis d'une prédiction par h-CLAT POSITIVE, deux valeurs de concentration efficace (CE), CE150 pour CD86 et CE200 pour CD54, peuvent être déterminées (c'est-à-dire la concentration à laquelle les produits chimiques d'essai génèrent une IRF de 150 ou 200). Ces valeurs de CE pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (9), dans le cadre d'une approche définie (AD) ou d'une approche intégrée IATA (4) (5) (6) (7) (8). Elles sont calculées à l'aide des équations ci-dessous :

$$\text{CE150 (pour CD86)} = B_{\text{concentration}} + [(150 - B_{\text{IRF}}) / (A_{\text{IRF}} - B_{\text{IRF}}) \times (A_{\text{concentration}} - B_{\text{concentration}})]$$

$$\text{CE200 (pour CD54)} = B_{\text{concentration}} + [(200 - B_{\text{IRF}}) / (A_{\text{IRF}} - B_{\text{IRF}}) \times (A_{\text{concentration}} - B_{\text{concentration}})]$$

où

Aconcentration est la plus faible concentration en $\mu\text{g/mL}$ générant une IRF $>$ 150 (CD86) ou 200 (CD54)

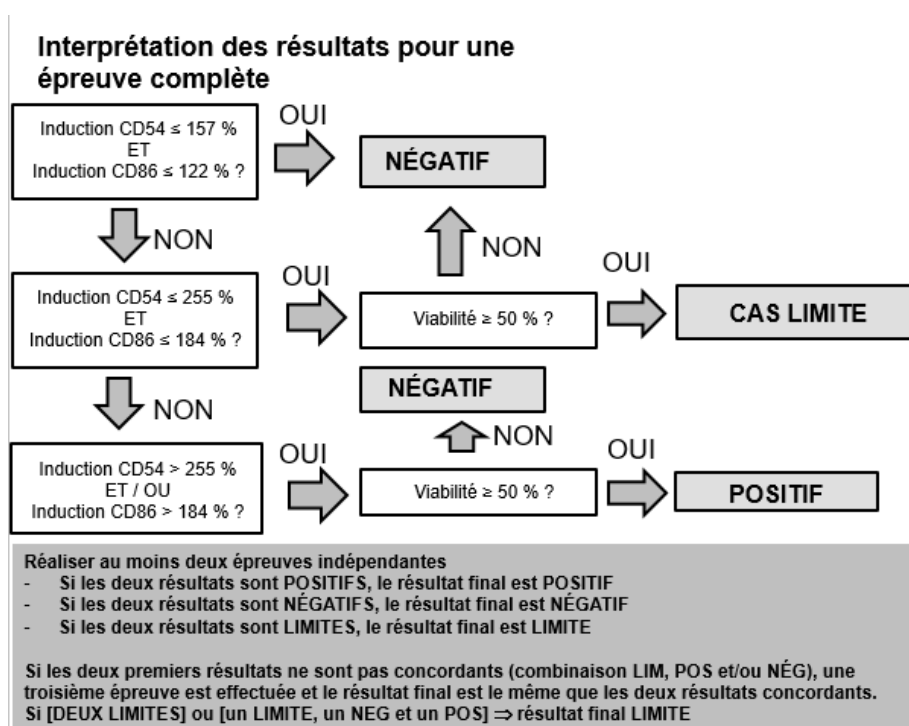
Bconcentration est la plus forte concentration en $\mu\text{g/mL}$ générant une IRF $<$ 150 (CD86) ou 200 (CD54)

AIRF est l'IRF à la plus faible concentration générant une IRF $>$ 150 (CD86) ou 200 (CD54)

BIRF est l'IRF à la plus forte concentration générant une IRF $<$ 150 (CD86) ou 200 (CD54)

Afin de déterminer avec plus de précision les valeurs CE150 et CE200, trois épreuves indépendantes de mesure de l'expression de CD86/CD54 peuvent être nécessaires. Les valeurs CE150 et CE200 finales sont alors définies comme la valeur médiane des CE calculées à partir des trois épreuves indépendantes. Si seules deux épreuves indépendantes sur trois satisfont aux critères de positivité (voir paragraphes 26-17), la valeur CE150 ou CE200 la plus élevée des deux est retenue.

Figure 1. Logigramme du modèle prédictif de h-CLAT tenant compte des plages de valeurs limites (PVL) et des épreuves répétées pour conclure quant aux résultats limites



Le seuil original pour une classification positive est une induction de 150% de CD86 avec une plage de valeurs limites dérivée statistiquement autour de ce seuil entre 122 et 184% et 200% d'induction de CD54 avec une plage de valeurs limites dérivée statistiquement autour de ce seuil entre 157 et 255%.

Critères d'acceptabilité

29. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de la méthode h-CLAT (22) (27) :

- - Les valeurs de viabilité cellulaire du témoin dans le milieu et du témoin de solvant/véhicule sont supérieures à 90 % ;
- - Pour le témoin de solvant/véhicule, les IRF de CD86 et de CD54 ne dépassent pas les critères de positivité (CD86 IRF \geq 150 % et CD54 IRF \geq 200 %). Les valeurs d'IRF pour le témoin de solvant/véhicule sont calculées suivant la formule indiquée au paragraphe 25 (en remplaçant la

mention « IMF du produit chimique » par « IMF du solvant/véhicule » et « IMF du solvant/véhicule » par « IMF du témoin (dans le milieu) » ;

- - Pour les deux témoins (milieu et solvant/véhicule), les ratios IMF CD86/témoin isotype et IMF CD54/témoin isotype sont > 105 % dans les deux cas ;
- - Pour le témoin positif (DNCB), les IRF de CD86 et de CD54 satisfont aux critères de positivité (CD86 IRF \geq 150 % et CD54 IRF \geq 200 %), avec une viabilité cellulaire > 50 % ; et
- - Pour le produit chimique d'essai, la viabilité cellulaire est > 50 % pour au moins quatre concentrations testées dans chaque épreuve.

30. Un résultat négatif n'est acceptable que pour les produits chimiques d'essai présentant une viabilité cellulaire inférieure à 90 % à la plus haute concentration testée (soit $1.2 \times CV75$, selon le schéma de dilutions en série décrit au paragraphe 20). Si la viabilité à $1.2 \times CV75$ est égale ou supérieure à 90 %, le résultat négatif n'est pas pris en compte. Dans ce cas, il est recommandé d'essayer d'affiner le choix des doses en répétant la détermination de CV75. Il convient de noter que, si une concentration de 5 000 $\mu\text{g/mL}$ dans la solution saline (ou dans le milieu ou autres solvants/véhicules), une concentration de 1 000 $\mu\text{g/mL}$ dans le DMSO, ou la concentration soluble la plus élevée est utilisée comme concentration maximale d'essai pour un produit chimique, un résultat négatif est acceptable même en présence d'une viabilité cellulaire supérieure à 90 %.

Rapport d'essai

31. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Produit chimique d'essai

- Substance mono-constituant
- identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
- apparence physique, Log K_{ow}, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, 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 ;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélange :
 - caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;
 - apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;

- masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
- 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 ;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Témoins

- Témoin positif
- identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
- apparence physique, Log K_{ow}, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- concentration(s) testée(s) ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Témoin négatif et témoin de solvant/véhicule
- identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- description de la méthode d'essai utilisée ;

- lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple) ;
- type de cytométrie en flux utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, globuline, anticorps et marqueur de cytotoxicité utilisés ;
- procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence et procédure appliquée pour démontrer une application reproductible dans le temps de la méthode d'essai, par exemple données historiques des témoins et/ou des contrôles de réactivité.

Critères d'acceptabilité de l'essai

- viabilité cellulaire, valeurs IMF et IRF avec le témoin de solvant/véhicule comparées à la plage d'acceptabilité ;
- viabilité cellulaire et valeurs IRF avec le témoin positif comparées à la plage d'acceptabilité ;
- viabilité cellulaire de toutes les concentrations testées du produit chimique d'essai.

Mode opératoire

- nombre d'épreuves réalisées ;
- concentration de produit chimique d'essai, application et moment d'exposition (si différent du moment recommandé) ;
- durée d'exposition (si différente de la durée recommandée) ;
- description des critères d'évaluation et de décision appliqués ;
- description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

- tableau des données, y compris CV75 (s'il y a lieu), IMF géométrique, IRF, valeurs de viabilité cellulaire, valeurs CE150/CE200 (s'il y a lieu) pour chaque produit chimique testé et substance témoin dans chaque épreuve, et indication de la classification du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif ;
- description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- discussion des résultats obtenus par la méthode h-CLAT ;
- examen des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

1. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006), Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
2. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007), Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
3. EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Disponible à l'adresse : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
4. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
5. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
6. Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012), Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
7. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014), Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
8. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
9. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015) Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
10. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016), Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
11. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012), Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.

12. EC EURL ECVAM (2015), Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
13. EC EURL ECVAM (2012), human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Disponible à l'adresse : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
14. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013), Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
16. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013), Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
17. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
18. DB-ALM (INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Disponible à l'adresse : <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
19. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008), Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70-82.
20. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. *AATEX* 15, 89-96.
21. OCDE (2005), Guidance Document No.34 on "the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment". Série de l'OCDE sur les essais et évaluations. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris, France, 2005, 96 pp.
22. OCDE (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. Disponible à l'adresse : [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)
23. Organisation des Nations Unies ONU (2013), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Cinquième édition révisée. New York & Genève : Publications des Nations Unies. ISBN: 978-92-1-216531-8. Disponible à l'adresse : http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/French/ST-SG-AC10-30-Rev5f.pdf.

24. ECETOC (2003), Contact sensitization: Classification according to potency. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques (Technical Report No. 87).

25. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008), Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

APPENDICE I - DÉFINITIONS

Précision : Étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa « pertinence ». Ce terme est souvent utilisé au sens de « concordance », pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (21).

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 analogues et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (22).

CV75 : concentration estimée générant une viabilité cellulaire de 75 %.

CE150 : concentrations générant des IRF de 150 pour l'expression de CD86.

CE200 : concentrations générant des IRF de 200 pour l'expression de CD54.

Cytométrie en flux : technique de cytométrie dans laquelle des cellules en suspension dans un fluide passent une par une dans un faisceau d'excitation lumineuse, le schéma de diffusion de la lumière étant caractéristique des cellules et de leurs composants ; les cellules sont souvent marquées avec des marqueurs fluorescents pour que la lumière soit d'abord absorbée puis émise à nouveau à une autre fréquence.

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

IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment, approches intégrées 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'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

Témoin avec milieu : réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

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

Substance mono-constituant : Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants : Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multi-constituants est le résultat d'une réaction chimique.

Témoin positif : Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du témoin positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

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

Pro-haptènes : produits chimiques acquérant un potentiel de sensibilisation cutanée suite à une activation enzymatique.

Intensité relative de fluorescence (IRF) : valeur relative de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF) des cellules exposées au produit chimique comparée à l'IMF des cellules exposées au solvant/véhicule.

Pertinence : Décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (21).

Fiabilité : Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (21).

Épreuve : consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

Sensibilité : Proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (21).

Tampon de coloration : tampon phosphate salin contenant 0.1 % albumine de sérum bovin.

Témoin de solvant/véhicule : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant/véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Spécificité : Proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (21).

Substance : Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance.

Produit chimique d'essai : Le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques) : 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 (23).

UVCB : Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

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 (21).

APPENDICE II : SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente annexe de la Ligne directrice 442E, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec la méthode h-CLAT pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs CV75, CE150 et CE200 compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10. 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 étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence de grande qualité *in vivo* et *in vitro* générées avec la méthode h-CLAT. Des données de référence publiées pour la méthode h-CLAT sont par ailleurs disponibles (3) (14).

Tableau 1 : Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode h-CLAT

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> ¹	CV75 plage de référence en g/mL ²	Résultats h-CLAT pour CD86 (CE150 plage de référence en g/mL) ²	Résultats h-CLAT pour CD54 (CE200 plage de référence en g/mL) ²
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	2-12	Positive (0.5-10)	Positive (0.5-15)
4-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (fort)	5-95	Positive (< 40)	Négative (> 1.5) ³
Sulfate de nickel	10101-97-0	Solide	Sensibilisant (modéré)	30-500	Positive (< 100)	Positive (10-100)
Mercapto-2-benzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	30-400	Négative (> 10) ³	Positive (10-140)
R(+)-Limonène	5989-27-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	> 20	Négative (> 5) ³	Positive (< 250)
Imidazolidinyl urée	39236-46-9	Solide	Sensibilisant (faible)	25-100	Positive (20-90)	Positive (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-sensibilisant	> 5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-sensibilisant	> 5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)

Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	1 500-5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Acide aminobenzoïque	4- 150-13-0	Solide	Non-sensibilisant	> 1 000	Négative (> 1 000)	Négative (> 1 000)

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

¹ Prédiction de danger (et de puissance) in vivo d'après les données ELGL (3) (14). La puissance in vivo est déterminée d'après les critères proposés par l'ECETOC (24).

² Basée sur les valeurs historiques observées (13) (25).

³ Historiquement, la majorité des résultats obtenus pour ce marqueur étaient négatifs, on attend donc un résultat le plus souvent négatif. La plage indiquée a été définie sur la base des quelques résultats positifs historiques. En cas de résultat positif, la valeur EC doit être comprise dans la plage de référence indiquée.

ANNEXE II : SENSIBILISATION CUTANÉE IN VITRO : TEST D'ACTIVATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE U937 (U-SENS™)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. La méthode U-SENS™ permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs cellulaires de surface associés au processus d'activation des monocytes et des cellules dendritiques (DC) (i.e. CD86), dans la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain U937, à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1). Le niveau d'expression mesuré pour le marqueur de surface CD86 dans la lignée cellulaire U937 peut alors apporter une aide pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.

2. La méthode d'essai U-SENS™ a fait l'objet d'une étude de validation (2) coordonnée par L'Oréal, suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (3). Après analyse des preuves disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'EURL ECVAM a recommandé l'utilisation de la méthode U-SENS™ (4) dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage. Dans son Guide relatif à la production de rapports sur les approches structurées d'intégration des données et d'utilisation de sources individuelles d'information dans le cadre d'une approche IATA pour la sensibilisation cutanée, l'OCDE analyse actuellement plusieurs études de cas décrivant diverses stratégies d'essai et différents modèles prédictifs. L'une des approches définies repose sur l'essai U-SENS (5). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données U-SENS™ combinées à d'autres sources d'information, y compris des données historiques et des données humaines valides pré-existantes (4) (5) (6) (7).

3. Il a été démontré que la méthode U-SENS™ est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et de l'analyse par cytométrie en flux. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par la méthode d'essai est de l'ordre de 90 % intra-laboratoire et 84 % inter-laboratoires (8). L'étude de validation (8) et d'autres études publiées (1) ont permis de conclure que, comparé aux résultats obtenus par la méthode ELGL, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) et non-sensibilisants est de 86 % (N = 166), la sensibilité est de 91 % (118/129) et la spécificité est de 65 % (24/37). En comparaison avec les résultats obtenus chez l'humain, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH) et non-sensibilisants est de 77 % (N = 101), la sensibilité est de 100 % (58/58) et la spécificité est de 47 % (20/43). En comparaison avec la méthode ELGL, il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec la méthode U-SENS™ concernent plus de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à

modérée (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH) que de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (c'est-à-dire sous-catégorie 1A) (1) (8) (9). L'ensemble de ces données montre l'utilité de la méthode U-SENS™ comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode d'essai U-SENS™ utilisée seule 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, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 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'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode U-SENS™ est applicable à des produits chimiques (y compris des ingrédients cosmétiques tels que conservateurs, tensioactifs, substances actives, colorants) couvrant divers groupes fonctionnels organiques, propriétés physico-chimiques, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études in vivo) et l'ensemble des mécanismes de réaction connus associés à la sensibilisation cutanée (i.e. accepteur de Michael, synthèse d'une base de Schiff, agent acylant, substitution nucléophile bimoléculaire [SN₂] ou substitution nucléophile aromatique [S_NAr]) (1) (8) (9) (10). La méthode U-SENS™ est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant/véhicule en formant plusieurs phases) dans un solvant/véhicule adapté (voir paragraphe 13). Les produits chimiques de la base de données signalés comme des pré-haptènes (substances activées par oxydation) ou des pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) ont été correctement identifiés par la méthode U-SENS™ (1) (10). Les substances pouvant conduire à la rupture de la membrane peuvent générer des faux-positifs dus à une augmentation non spécifique de l'expression de CD86. En effet, 3/7 des faux-positifs comparés à la classification de référence in vivo étaient des tensioactifs (1). Pour cette raison, les résultats positifs avec les tensioactifs doivent être traités avec précaution, tandis que les résultats négatifs avec les tensioactifs peuvent être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme non-sensibilisant. Il est possible de tester des produits chimiques fluorescents avec la méthode U-SENS™ (1), cependant les produits fortement fluorescents qui émettent dans la même longueur d'onde que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou que l'iodure de propidium (IP) causent une interférence avec la détection par cytométrie en flux. Ces produits ne peuvent donc pas être adéquatement analysés avec des anticorps conjugués au FITC (risque de faux-négatif) ou à l'IP (viabilité non mesurable). Dans ce cas, on peut recourir respectivement au marquage des anticorps par d'autres fluorochromes, ou à d'autres marqueurs de cytotoxicité, respectivement, à condition qu'il soit démontré, p.ex. en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice II, que ces techniques génèrent des résultats similaires aux anticorps marqués au FITC ou à l'IP (voir paragraphe 18). À la lumière de ce qui précède, les résultats positifs avec les tensioactifs et les résultats négatifs avec des produits chimiques fortement fluorescents devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et combinés avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. S'il est démontré que la méthode U-SENS™ n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

5. Comme indiqué ci-dessus, la méthode U-SENS™ aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation. Des travaux complémentaires,

s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats de l'essai U-SENS™ pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation.

6. Les définitions sont fournies à l'Appendice I.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La méthode U-SENS™ est un essai in vitro qui permet de quantifier les variations d'expression du marqueur de surface CD86 des cellules d'une lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain (cellules U937) après une exposition de 45 ± 3 heures à un produit chimique d'essai. Le marqueur de surface CD86 est typique de l'activation des cellules U937. Il s'agit d'une molécule de costimulation connue pour simuler l'activation monocytaire, étape critique dans l'amorçage des lymphocytes T. La variation d'expression du marqueur de surface CD86 est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La cytotoxicité est mesurée en parallèle (en utilisant l'IP, par exemple) pour savoir si la surexpression du marqueur de surface CD86 a lieu à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité. L'indice de stimulation (I.S.) du marqueur de surface CD86, comparé à celui du témoin de solvant/véhicule, est calculé et inséré dans un modèle prédictif (voir paragraphe 19), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

8. Avant d'utiliser en routine la méthode décrite dans la présente annexe à la Ligne directrice 442E, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'appendice II, conformément aux Bonnes pratiques pour les méthodes in vitro (11). En outre, les utilisateurs de la méthode devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité (voir paragraphe 11), avec le témoin positif et avec le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 15-16), et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité de la méthode d'essai au sein de leur laboratoire à long terme.

PROCÉDURE

9. La présente méthode d'essai est basée sur le protocole U-SENS™ n° 183 de la base de données sur les méthodes de substitution (DB-ALM) (12). Le mode opératoire normalisé doit être suivi lors de la mise en œuvre et de l'emploi de la méthode d'essai U-SENS™ en laboratoire. Un système automatisé d'utilisation du U-SENS™ peut être employé s'il est prouvé qu'il génère des résultats comparables, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice II. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires pour la méthode U-SENS™.

Préparation des cellules

10. Il convient d'utiliser la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain, U937 (13), pour mettre en œuvre la méthode U-SENS™. Les cellules (clone CRL1593.2) seront obtenues auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple l'American Type Culture Collection.

11. Les cellules U937 sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % CO₂, dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM L-glutamine, 100 unités/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine (milieu complet). Les cellules U937 sont repiquées

régulièrement tous les 2 ou 3 jours à une densité de 1,5 ou 3 x 10⁵ cellules/mL, respectivement. La densité cellulaire n'excède pas 2 x 10⁶ cellules/mL et la viabilité cellulaire mesurée par l'exclusion du bleu de Trypan est ≥ 90 % (ce critère ne doit pas être appliqué au premier passage après décongélation). Avant utilisation pour l'essai, chaque lot de cellules, de SVF ou d'anticorps doit être qualifié par une vérification de réactivité. La vérification de réactivité des cellules est réalisée avec le témoin positif, l'acide picrylsulfonique (acide 2,4,6-trinitro-benzènesulfonique : TNBS) (N^oCAS 2508-19-2, pureté ≥ 99 %) et avec le témoin positif, l'acide lactique (N^oCAS 50-21-5, pureté ≥ 85 %) au moins une semaine après décongélation. La vérification de réactivité est réalisée avec six concentrations finales pour chacun des témoins (TNBS : 1 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 µg/mL et acide lactique : 1 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 µg/mL). Le TNBS dissous dans du milieu complet doit générer une réponse pour CD86 positive et dépendante de la concentration (i.e. à partir d'une concentration donnant une réponse positive, I.S. CD86 ≥ 150, la concentration supérieure donne une I.S. CD86 croissante) et l'acide lactique dissous dans du milieu complet doit générer une réponse négative pour CD86 (voir paragraphe 21). Seuls les lots de cellules soumis avec succès à deux reprises à la vérification de réactivité sont utilisés dans l'essai. Les cellules peuvent être repiquées jusqu'à sept semaines après décongélation. Un maximum de 21 repiquages est possible. La vérification de réactivité doit être réalisée suivant le protocole décrit aux paragraphes 18 à 22.

12. Pour l'essai, les cellules U937 sontensemencées à une densité de 3 x 10⁵ cellules/mL ou de 6 x 10⁵ cellules/mL, puis pré-cultivées dans des flacons de culture pendant 2 ou 1 jour(s), respectivement. D'autres conditions de pré-culture que celles indiquées ci-dessus peuvent être utilisées, à condition que les raisons scientifiques en soient expliquées et s'il est prouvé que ces conditions génèrent des résultats comparables, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice II. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et suspendues à une densité de 5 x 10⁵ cellules/mL dans un milieu frais. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une plaque 96 puits à fond plat, à raison de 100 µL/puits (densité cellulaire finale 0,5 x 10⁵ cellules/puits).

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

13. L'évaluation de la solubilité est réalisée avant l'essai. À cet effet, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable à une concentration de 50 mg/mL, en choisissant de préférence comme solvant/véhicule le milieu complet, ou, en deuxième option, le diméthylsulfoxyde (DMSO, pureté ≥ 99 %) si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le milieu complet. Pour l'essai, la concentration finale du produit chimique d'essai est de 0,4 mg/mL en milieu complet si le produit chimique est soluble dans ce solvant/véhicule. Si le produit chimique n'est soluble que dans le DMSO, la concentration du produit chimique d'essai est de 50 mg/mL. Il est possible d'utiliser d'autres solvants/véhicules que ceux indiqués ci-dessus, à condition que les raisons scientifiques en soient expliquées. Il importe de tenir compte de la stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule.

14. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Étant donné qu'aucun essai de détermination de la dose n'est mené, on testera, pour la première épreuve, six concentrations finales (1, 10, 20, 50, 100 et 200 µg/mL) dans le solvant/véhicule correspondant, soit du milieu complet, soit du DMSO à 0,4 % dans du milieu. Pour les épreuves suivantes, en partant de solutions de produits chimiques d'essai à une concentration de 0,4 mg/mL dans du milieu complet ou de 50 mg/mL dans du DMSO, au moins quatre solutions de travail (i.e. au moins quatre concentrations) sont préparées avec le solvant/véhicule correspondant. Pour finir, les solutions de travail sont utilisées pour le traitement en ajoutant un même volume de cellules U937 en suspension (voir paragraphe 11 ci-dessus) au volume de solution de travail dans la plaque, pour parvenir à une dilution supplémentaire de facteur 2. Les concentrations (au moins quatre) pour toute épreuve supplémentaire sont choisies en fonction des

résultats particuliers de toutes les épreuves précédentes (8). Les concentrations finales utilisables sont 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 100 ; 120 ; 140 ; 160 ; 180 et 200 µg/mL. La concentration finale maximale est 200 µg/mL. Si une valeur positive est obtenue pour CD86 à 1 µg/mL, il convient de tester à 0,1 µg/mL pour trouver la concentration de produit chimique d'essai qui ne franchit pas le seuil de positivité de CD86. Pour chaque épreuve, la valeur EC150 (concentration à laquelle les produits chimiques d'essai atteignent le seuil de positivité de 150 % pour CD86, voir paragraphe 19) est calculée si une réponse positive pour CD86 dépendante de la concentration est observée. Si un produit chimique d'essai induit une réponse positive pour CD86 non dépendante de la concentration, le calcul de la valeur EC150 peut ne pas être pertinent, comme décrit au protocole U-SENS™ DB-ALM n°183 (12). Pour chaque épreuve, la valeur CV70 (concentration à laquelle les produits chimiques d'essai atteignent le seuil de cytotoxicité de 70 %, voir paragraphe 19) est calculée chaque fois que possible (12). Pour évaluer l'effet reliant la concentration à la réponse pour CD86, toutes les concentrations choisies parmi les concentrations utilisables doivent être bien réparties entre l'EC150 (ou la concentration la plus élevée non cytotoxique induisant une réponse négative pour CD86) et la VC70 (ou la plus haute concentration permise, i.e. 200 µg/mL). Au moins quatre concentrations par épreuve doivent être testées, avec au moins deux concentrations communes avec la ou les épreuve(s) précédente(s), à des fins de comparaison.

15. Le témoin de solvant/véhicule utilisé dans la méthode U-SENS™ est le milieu complet (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable) (voir paragraphe 4) ou le DMSO à 0,4 % dans du milieu complet (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le DMSO).

16. Le témoin positif utilisé dans la méthode U-SENS™ est le TNBS (voir paragraphe 11), préparé dans du milieu complet. Le TNBS doit être utilisé comme témoin positif pour la mesure de l'expression de CD86 à une concentration finale unique dans la plaque (50 µg/mL) générant une viabilité cellulaire > 70 %. Pour arriver à une concentration de 50 µg/L de TNBS dans la plaque, une solution de base de TNBS à 1 M (soit 293 mg/mL) dans du milieu complet est préparée, avant de procéder à une dilution de facteur de 2930 dans du milieu complet jusqu'à obtenir une solution de travail à 100 µg/mL. L'acide lactique (CAS 50-21-5) est utilisé comme témoin négatif à 200 µg/mL dissous dans du milieu complet (à partir d'une solution de base à 0,4 mg/mL). Pour chaque plaque de chaque épreuve, trois réplicats de milieu complet témoin non traité, de témoin de solvant/véhicule et de témoins négatif et positif, sont préparés (12). D'autres témoins positifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves. Les critères d'acceptabilité de l'épreuve sont identiques à ceux des produits chimiques d'essai (voir paragraphe 12).

Application des produits testés et des témoins

17. Le témoin de solvant/véhicule ou les solutions de travail décrites aux paragraphes 14 à 16 sont mélangés en proportion 1:1 (v/v) avec les suspensions de cellules préparées dans la plaque microtitre 96 puits à fond plat (voir paragraphe 12). Les plaques traitées sont placées en incubation pendant 45 ± 3 heures à 37°C, 5 % CO₂. Avant incubation, les plaques sont scellées avec une membrane semi-perméable, afin d'éviter toute évaporation de produits chimiques d'essai volatiles et toute contamination croisée entre les cellules traitées avec les produits chimiques d'essai (12).

Coloration cellulaire

18. Après une exposition de 45 ± 3 heures, les cellules sont transférées dans une plaque microtitre à fond conique et collectées par centrifugation. L'interférence de solubilité correspond à la présence de cristaux ou de gouttelettes visibles au microscope après 45 ± 3 heures de traitement et avant coloration

cellulaire. Les surnageants sont éliminés et les cellules restantes sont rincées une fois dans 100 µL de tampon phosphate salin (PBS) glacé contenant 5 % sérum de veau fœtal (tampon de coloration). Les cellules sont centrifugées, puis re-suspendues dans 100 µL de tampon de coloration et colorées avec 5 µL (soit 0,25 µg) d'anticorps anti-CD86 ou anticorps murins isotype IgG1 marqués au FITC, à 4°C pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Les anticorps décrits dans le protocole U-SENS™ DB-ALM n°183 (12) doivent être utilisés (pour CD86 : BD-PharMingen #555657 Clone: Fun-1, ou Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63 ; pour IgG1 : BD-PharMingen #555748, ou Caltag/Invitrogen # GM4992). L'expérience acquise lors de la mise au point de la méthode d'essai indique que l'intensité de la fluorescence des anticorps est généralement comparable d'un lot à un autre. Il est possible d'utiliser d'autres clones ou d'autres fournisseurs d'anticorps pour l'essai, si ceux-ci ont été soumis avec succès à la vérification de réactivité (voir paragraphe 11). Cependant, les utilisateurs peuvent souhaiter procéder au titrage des anticorps dans leurs conditions de laboratoire, afin de déterminer la concentration la mieux adaptée. D'autres méthodes de détection, par exemple des anticorps anti-CD86 marqués avec d'autres fluorochromes, peuvent être utilisées s'il est prouvé qu'elles génèrent des résultats comparables aux anticorps marqués au FITC, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice II. Après deux rinçages dans 100 µL de tampon de coloration et un rinçage dans 100 µL de PBS glacé, les cellules sont suspendues dans du PBS glacé (par exemple, 125 µL pour les échantillons analysés tube après tube, manuellement, ou 50 µL pour une plaque d'auto-échantillonneur) et on ajoute la solution d'IP (concentration finale 3 µg/mL). D'autres marqueurs de cytotoxicité tels que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou le bleu de Trypan peuvent être utilisés comme colorants s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables à l'IP, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice II.

Analyse par cytométrie en flux

19. Le niveau d'expression de CD86, ainsi que la viabilité cellulaire, sont analysés par cytométrie en flux. Les cellules sont placées sur graphique à points à échelle logarithmique, suivant leur taille (FSC) et leur granularité (SSC), pour repérer clairement la population dans la fenêtre R1 et éliminer les débris. L'objectif est d'acquérir 10 000 cellules dans la fenêtre R1, pour chaque puits. Les cellules appartenant à une même fenêtre R1 sont représentées sur un graphique à points FL3 ou FL4/SSC. Les cellules viables sont identifiées en traçant une deuxième fenêtre R2 de sélection de la population cellulaire négative à l'iodure de propidium (canaux FL3 ou FL4). La viabilité cellulaire est calculée par le programme d'analyse du cytomètre suivant l'équation ci-après. Si la viabilité cellulaire est faible, il convient d'acquérir jusqu'à 20 000 cellules, dont des cellules mortes. Une autre option est d'acquérir les données pendant une minute après le début de l'analyse.

$$\text{Viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total de cellules acquises}} \times 100$$

Le pourcentage de cellules FL1-positives est ensuite mesuré parmi les cellules viables retenues dans la fenêtre R2 (sous-fenêtre de R1). L'expression de CD86 à la surface cellulaire est analysée au moyen d'un graphique à points FL1/SSC ne prenant en compte que les cellules viables (R2).

Pour les puits contenant du milieu complet/IgG1, le seuil d'analyse est fixé proche de la population principale pour que les témoins en milieu complet présentent une valeur IgG1 dans la zone cible de 0,6 à 0,9 %.

L'interférence de couleur est définie comme un décalage de la dispersion correspondant aux IgG1 marqués au FITC (moyenne géométrique d'I.S. IgG1 FL1 \geq 150 %).

L'indice de stimulation (I.S.) de CD86 pour les cellules témoin (non traitées ou dans du DMSO à 0,4 %) et pour les cellules traitées avec les produits chimiques est obtenu par le calcul suivant :

$$\text{I.S.} = \frac{\% \text{ cellules traitées CD86}^+ - \% \text{ cellules traitées IgG1}^+}{\% \text{ cellules témoin CD86}^+ - \% \text{ cellules témoin IgG1}^+} \times 100$$

% cellules témoin non traitées IgG1+ : pourcentage de cellules FL1-positives reconnues par IgG1 dépassant le seuil d'analyse (plage d'acceptation \geq 0,6 % et $<$ 1,5 %, voir paragraphe 22) parmi les cellules viables non traitées.

% cellules témoin IgG1+ ou traitées CD86+ : pourcentage de cellules FL1-positives reconnues par IgG1 ou CD86 mesuré sans déplacer le seuil d'analyse, parmi les cellules viables témoin ou traitées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

20. Les paramètres suivants sont calculés dans la méthode d'essai U-SENS™ : valeur CV70, c'est-à-dire la concentration générant une survie de 70 % des cellules U937 (cytotoxicité 30 %) et la valeur EC150, c'est-à-dire la concentration à laquelle les produits chimiques d'essai induisent un indice de stimulation (I.S.) de CD86 de 150 %.

La valeur CV70 est calculée par interpolation semi-logarithmique suivant l'équation ci-après :

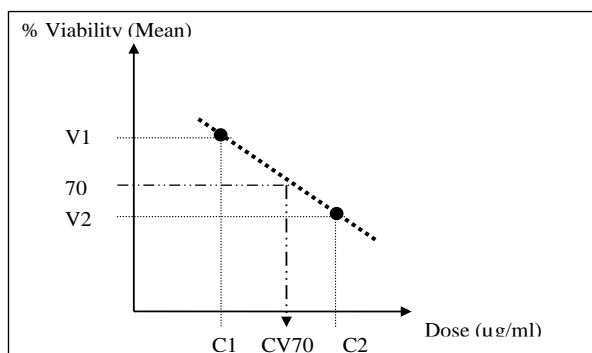
$$\text{CV70} = \text{C1} + [(\text{V1} - 70) / (\text{V1} - \text{V2}) * (\text{C2} - \text{C1})]$$

Où :

V1 est la valeur minimum de viabilité cellulaire supérieure à 70 %

V2 est la valeur maximum de viabilité cellulaire inférieure à 70 %

C1 et C2 sont les concentrations auxquelles les viabilisés cellulaires V1 et V2 sont atteintes, respectivement.



Il est possible d'employer d'autres approches pour déduire la valeur CV70, à condition que cela ne modifie pas les résultats (par exemple, en testant les substances d'épreuve).

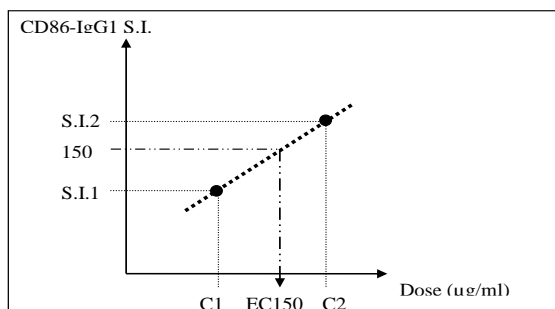
L'EC150 est calculée par interpolation log-linéaire suivant l'équation ci-après :

$$EC150 = C1 + [(150 - I.S.1) / (S.I.2 - I.S.1) * (C2 - C1)]$$

Où :

C1 est la concentration la plus élevée, en µg/mL, avec un I.S. CD86 < 150 % (I.S. 1).

C2 est la concentration la plus faible, en µg/mL, avec un I.S. CD86 ≥ 150 % (I.S. 2).



Les valeurs EC150 et CV70 sont calculées

- pour chaque épreuve : les valeurs EC150 et CV70 sont utilisées comme outils d'investigation de l'effet reliant la concentration à la réponse dans la surexpression de CD86 (voir paragraphe 14),
- la valeur CV70 globale est déterminée en fonction de la viabilité moyenne (12),
- la valeur EC150 globale d'un produit chimique d'essai dont la prédiction est un résultat POSITIF avec l'essai U-SENS™ est déterminée en fonction des valeurs moyennes d'I.S. CD86 (voir paragraphe 21) (12).

Modèle prédictif

21. Pour les mesures d'expression de CD86, chaque produit chimique d'essai est testé à au moins quatre concentrations et dans au moins deux épreuves indépendantes (réalisées en des jours distincts) pour arriver à une prédiction unique (NÉGATIF ou POSITIF).

- La conclusion individuelle pour une épreuve U-SENS™ est Négative (ci-après N) si l'I.S. de CD86 est inférieur à 150 % à toutes les concentrations non cytotoxiques (viabilité cellulaire ≥ 70 %) et si aucune interférence n'est observée (cytotoxicité, solubilité : voir paragraphe 18, ou couleur : voir paragraphe 19, quelles que soient les concentrations non cytotoxiques auxquelles l'interférence est détectée). Dans tous les autres cas : pour un I.S. de CD86 supérieur ou égal à 150 % et/ou l'observation d'une interférence, la conclusion individuelle pour une épreuve U-SENS™ est Positive (ci-après P).
- Une prédiction U-SENS™ est considérée comme NÉGATIVE si au moins deux épreuves indépendantes génèrent un résultat négatif (N) (Figure 1). Si les deux premières épreuves génèrent un résultat N, la prédiction U-SENS™ est considérée comme NÉGATIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve.
- Une prédiction U-SENS™ est considérée comme POSITIVE si au moins deux épreuves indépendantes génèrent un résultat positif (P) (Figure 1). Si les deux premières épreuves génèrent un résultat P, la prédiction U-SENS™ est considérée comme POSITIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve.
- Étant donné qu'aucun essai de détermination de la dose n'est mené, il peut y avoir une exception si, lors de la première épreuve, l'I.S. de CD86 est supérieur ou égal à 150 % à la plus haute concentration non cytotoxique seulement. Dans ce cas, l'épreuve est considérée comme NON CONCLUANTE (NC) et d'autres concentrations doivent être testées lors d'épreuves supplémentaires (entre la plus haute concentration non cytotoxique et la plus faible concentration cytotoxique, voir paragraphe 20). Si une épreuve est considérée comme NC, il convient de mener au moins deux épreuves supplémentaires, voire trois si les résultats des épreuves deux et trois sont non-concordants (N et/ou P, au choix) (Figure 1). Les épreuves suivantes sont considérées comme positives même si seule l'une des concentrations non cytotoxiques génère une valeur pour CD86 supérieure ou égale à 150 %, étant donné que les paramètres de concentration ont été adaptés spécifiquement à ce produit chimique d'essai. La prédiction finale s'appuie sur le résultat majoritaire pour l'ensemble des trois ou quatre épreuves individuelles (soit 2 sur 3 ou 2 sur 4) (Figure 1).

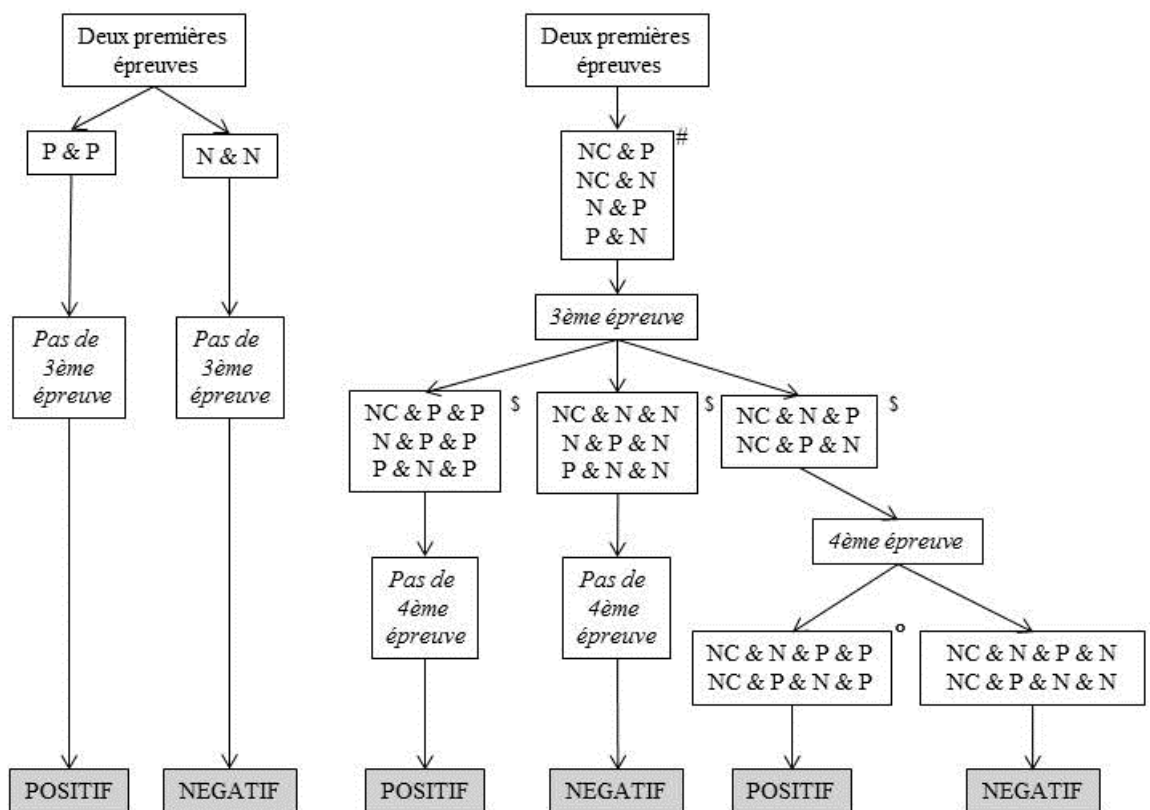


Figure 1 : modèle prédictif utilisé dans la méthode U-SENS™. Toute prédiction émise avec l'essai U-SENS™ doit être considérée dans le cadre d'une approche intégrée IATA et conformément aux dispositions du paragraphe 4 et des paragraphes 7, 8 et 9 de l'introduction générale.

N : épreuve sans résultat positif pour CD86 ni interférence ;

P : épreuve avec résultat positif pour CD86 et/ou interférence(s) ;

NC : non concluant. Première épreuve non concluante si CD86 est positif uniquement à la concentration non cytotoxique la plus élevée ;

: un résultat individuel non concluant (NC) attribué uniquement lors de la première épreuve nécessite de mener une troisième épreuve pour obtenir une majorité de résultats positifs (P) ou négatifs (N) pour au moins deux épreuves indépendantes sur trois ;

\$: les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des trois épreuves sur la base des résultats obtenus dans les deux premières épreuves (cases précédentes) ;

° : les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des quatre épreuves sur la base des résultats obtenus dans les trois premières épreuves (cases précédentes).

Critères d'acceptabilité

22. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de la méthode U-SENS™ (12) :

- Après une exposition de 45 ± 3 heures, la viabilité moyenne des trois réplicats de cellules U937 non traitées doit être $> 90 \%$ et aucune dérive d'expression de CD86 ne doit être observée. La fourchette d'expression basale de CD86 dans les cellules U937 doit être $\geq 2 \%$ et $\leq 25 \%$.
- Si le solvant utilisé est le DMSO, la validité du DMSO comme témoin de véhicule est évaluée en calculant l'I.S. du DMSO comparé à celui des cellules non traitées et la viabilité moyenne des trois réplicats de cellules doit être $> 90 \%$. Le témoin de véhicule DMSO est valide si l'I.S. moyen pour CD86 dans les trois réplicats de DMSO est inférieur à 250% de l'I.S. moyen pour CD86 dans les trois réplicats de cellules U937 non traitées.
- Les épreuves sont considérées comme valides si au moins deux des trois valeurs IgG1 des cellules U937 non traitées sont comprises dans la plage $\geq 0,6 \%$ et $< 1,5 \%$.
- Le témoin négatif (acide lactique) testé en parallèle est considéré comme valide si au moins deux des trois réplicats génèrent un résultat négatif (I.S. CD86 $< 150 \%$) et aucune cytotoxicité (viabilité cellulaire $\geq 70 \%$).
- Le témoin positif (TNBS) est considéré comme valide si au moins deux des trois réplicats génèrent un résultat positif (I.S. CD86 $\geq 150 \%$) et aucune cytotoxicité (viabilité cellulaire $\geq 70 \%$).

Rapport d'essai

23. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Produit chimique d'essai

- Substance mono-constituant
 - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
 - Apparence physique, solubilité dans le milieu complet, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, 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 ;
 - Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.
- 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, solubilité dans le milieu complet, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;

- Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
- 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 ;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Témoins

- Témoin positif :
 - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
 - Apparence physique, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
 - Concentration(s) testée(s) ;
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Témoin négatif et solvant/véhicule témoin
 - Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
 - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
 - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- Description de la méthode d'essai utilisée ;

- Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple) ;
- Type de cytométrie en flux utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, anticorps et marqueurs de cytotoxicité utilisés ;
- Procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence et procédure appliquée pour démontrer une application reproductible dans le temps de la méthode d'essai, par exemple données historiques des témoins et/ou des vérifications de réactivité.

Critères d'acceptabilité de l'essai

- Viabilité cellulaire et I.S. CD86 avec le témoin de solvant/véhicule comparées aux plages d'acceptabilité ;
- Viabilité cellulaire et I.S. avec le témoin positif comparées aux plages d'acceptabilité ;
- Viabilité cellulaire de toutes les concentrations testées du produit chimique d'essai.

Mode opératoire

- Nombre d'épreuves effectuées ;
- Concentration de produit chimique d'essai, application et moment d'exposition (si différents du moment recommandé) ;
- Durée d'exposition ;
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués ;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

- Tableau des données, y compris CV70 (s'il y a lieu), I.S., viabilité cellulaire, EC150 (s'il y a lieu) pour chaque produit chimique testé et substance témoin pour chaque épreuve, et indication de l'évaluation du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif ;
- Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- Discussion des résultats obtenus par la méthode U-SENS™ ;
- Examen des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

1. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
2. EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
3. EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No. 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Available at: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
4. EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Available at: [<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>].
5. Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
6. 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, Series on Testing & Assessment No. 256, [ENV/JM/MONO\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
7. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
8. Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
9. Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
10. Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
11. OECD (2017). Draft Guidance document: Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of In Vitro Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf].

12. DB-ALM (2016). Protocol no. 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
13. Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
14. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
15. United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf].
16. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
17. ECETOC (2003). Technical Report No. 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Available at: [https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf].

APPENDICE I : DÉFINITIONS

AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables) : séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable in vivo, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (15).

CV70 : concentration estimée générant une viabilité cellulaire de 70 %.

Cytométrie en flux : technique de cytométrie dans laquelle des cellules en suspension dans un fluide passent une par une dans un faisceau d'excitation lumineuse ; la lumière est diffusée selon les caractéristiques des cellules et de leurs composants ; les cellules sont souvent marquées avec des marqueurs fluorescents pour que la lumière soit d'abord absorbée puis émise à nouveau à une autre fréquence.

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

Dérive : i) la valeur corrigée %CD86+ pour le réplicat 3 du témoin non traité est inférieure à 50 % de la moyenne corrigée de la valeur %CD86+ pour les réplicats 1 et 2 du témoin non traité ; et ii) la valeur corrigée %CD86+ pour le réplicat 3 du témoin négatif est inférieure à 50 % de la moyenne corrigée de la valeur %CD86+ pour les réplicats 1 et 2 du témoin négatif.

EC150 : concentrations estimées générant un I.S. de 150 % pour l'expression de CD86.

Épreuve : consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

Fiabilité : indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (14).

IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment, approches intégrées 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'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

I.S. : indice de stimulation. Valeur relative de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF) des cellules exposées au produit chimique comparée à l'IMF des cellules dans le solvant/véhicule.

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

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 (14).

Pertinence : décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit

correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (14).

Précision : étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa « pertinence ». Ce terme est souvent utilisé au sens de « concordance », pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (14).

Pré-haptènes : produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique, par exemple par oxydation.

Produit chimique d'essai : le terme « 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.

Réponse de CD86 liée à la concentration : lorsqu'une concentration générant un résultat positif (I.S. CD86 \geq 150) est suivie d'une concentration présentant un I.S. CD86 encore supérieur, l'effet est dépendant de la concentration (réponse liée à la concentration).

Sensibilité : proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par le test. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (14).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): 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 (16).

Spécificité : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (14).

Substance : élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance.

Substance mono-constituant : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration \geq 10 % (m/m) et $<$ 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

Tampon de coloration : solution tamponnée de phosphate contenant 5 % sérum de veau fœtal.

Témoin de solvant/véhicule : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant /véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin positif : réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

UVCB : substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.

APPENDICE II : SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente annexe de la Ligne directrice 442E, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec l'essai U-SENS™ pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs CV70 et EC150 compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10. 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 étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence *in vivo* et de données *in vitro* de grande qualité générées avec la méthode U-SENS™. De plus, les données de référence publiées sont disponibles pour la méthode U-SENS™ (1) (8).

Tableau 1 : substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode U-SENS™

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> ¹	U-SENS™ Solvant / Véhicule	U-SENS™ CV70 plage de référence en µg/mL ²	U-SENS™ EC150 plage de référence en µg/mL ²
4-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (fort)	Milieu complet ³	< 30	Positif (≤ 10)
Acide picrylsulfonique	2508-19-2	Liquide	Sensibilisant (fort)	Milieu complet	> 50	Positif (≤ 50)
Maléate de diéthyle	141-05-9	Liquide	Sensibilisant (modéré)	DMSO	10-100	Positif (≤ 20)
Résorcinol	108-46-3	Solide	Sensibilisant (modéré)	Milieu complet	(> 100)	Positif (≤ 50)
Alcool cinnamique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	DMSO	(> 100)	Positif (10-100)
4-Allylanisole	140-67-0	Liquide	Sensibilisant (faible)	DMSO	(> 100)	Positif (< 200)
Saccharine	81-07-2	Solide	Non-sensibilisant	DMSO	> 200	Négatif (> 200)
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-sensibilisant	Milieu complet	> 200	Négatif (> 200)
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Milieu complet	> 200	Négatif (> 200)
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non-sensibilisant	DMSO	> 200	Négatif (> 200)

Abréviations : N°CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

¹Prédiction de danger (et de puissance) *in vivo* d'après les données ELGL (1) (8). La puissance *in vivo* est obtenue d'après les critères proposés par l'ECETOC (17).

²Basée sur les valeurs historiques observées (1) (8).

³ Milieu complet : milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine, 100 unités/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine (8).

ANNEXE III SENSIBILISATION CUTANÉE IN VITRO : ESSAI PAR GÈNE RAPPOREUR DE L'INTERLEUKINE 8 (MÉTHODE D'ESSAI IL-8 LUC)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. Contrairement à des essais visant à analyser le niveau d'expression de marqueurs de surface, le test IL-8 Luc permet de quantifier les variations d'expression de IL 8, une cytokine associée à l'activation des cellules dendritiques (DC) (1) (2). Dans la lignée cellulaire rapporteur IL 8 dérivée de la lignée THP 1 (THP G8, issue de la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP 1), l'expression d'IL 8 est mesurée à la suite de l'exposition à des sensibilisants (2) (3) (4). Le niveau d'expression de la luciférase est ensuite utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés. En 2023, la méthode d'essai a été mise à jour avec un modèle de prédiction révisé améliorant l'applicabilité de la méthode à certains produits chimiques peu solubles, sur la base de l'évaluation de la cytotoxicité à l'aide d'un marqueur intrinsèque de viabilité (5).
2. La méthode IL 8 Luc a fait l'objet d'une étude de validation (5) menée par le Centre japonais de validation des méthodes de substitution (JaCVAM), le Ministère de l'économie, du commerce et de l'industrie (METI) et la Société japonaise pour les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (JSAAE), suivie d'un examen indépendant par des pairs (6) sous la conduite du JaCVAM et du Ministère de la santé, du travail et des affaires sociales (MHLW), avec l'appui de la Coopération internationale relative aux méthodes de substitution à l'expérimentation animale (ICATM). Après analyse des preuves disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, la méthode IL 8 Luc est considérée comme utile dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA (approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données IL 8 Luc combinées à d'autres sources d'information (3) (7).
3. Il a été démontré que la méthode IL 8 Luc est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et des mesures de la luciférase. Le niveau de reproductibilité était de l'ordre de 87,7 % intra-laboratoire et 87,5 % inter-laboratoires (5). Les données obtenues lors de l'étude de validation (5) et dans les autres travaux publiés (3) (4) (8) présentent la performance de la méthode IL 8 Luc et la comparent à celle de la méthode ELGL. Dans ces études, la méthode IL 8 Luc a permis d'émettre une prédiction positive ou négative pour 130/143 produits chimiques et a fourni des résultats non concluants pour 13 produits chimiques. La précision de la méthode IL 8 Luc était de 83,6% (109/130), sa sensibilité de 92,0% (92/100) et sa spécificité de 56,7% (17/30) pour faire la distinction entre les produits

chimiques sensibilisants (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et non sensibilisants (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU). En ne tenant pas compte des substances en dehors de son domaine d'applicabilité, telles que les surfactants, les anhydrides et les substances interférant avec la luciférase, voir ci-dessous (paragraphe 6), la sensibilité de la méthode IL 8 Luc était de 93,9%, (92/98), la spécificité de 68,0% (17/25) et la précision de 88,6% (109/123). Reprenant des données chez l'humain citées dans Urbisch et al. (7), la méthode IL 8 Luc a permis de classer 84/90 produits chimiques comme positifs ou négatifs, et 6 produits chimiques comme non concluants. La performance était de 89,7 % (52/58) pour la sensibilité, de 50,0 % (13/26) pour la spécificité et de 77,4 % (65/84) pour la précision. En ne tenant pas compte des substances en dehors de son domaine d'applicabilité, la méthode IL 8 Luc a permis de classer 78/84 produits chimiques comme positifs ou négatifs et 6 produits chimiques comme non concluants. La précision de la méthode IL 8 Luc était de 82,1 % (64/78), la sensibilité de 89,7 % (52/58) et la spécificité de 60,0 % (12/20). La différence de performance de la méthode IL 8 Luc pour les produits chimiques avec $\text{LogK}_{o/e} < 3,5$ et ceux avec $\text{LogK}_{o/e} \geq 3,5$ a été examinée et il a été démontré qu'un $\text{LogK}_{o/e} \geq 3,5$ ne réduisait pas la sensibilité de la méthode IL 8 Luc (8).

4. Il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec la méthode IL 8 Luc concernent plus de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (sous-catégorie 1B du SGH) que de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (sous-catégorie 1A) (3) (4) (8). Dans leur ensemble, les informations indiquent que la méthode IL 8 Luc aide à évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Les valeurs relatives à la précision de la méthode d'essai IL 8 Luc utilisée seule 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, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 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.

5. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode IL 8 Luc est applicable à des produits chimiques d'essai couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études in vivo) et propriétés physico-chimiques (3) (4) (5). La méthode IL 8 Luc est également techniquement applicable aux substances multi-constituants et aux mélanges. Toutefois, les mélanges qui ne se dissolvent pas complètement à 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 et qui donnent des résultats négatifs peuvent contenir des sensibilisants dont la présence pourrait être masquée par la cytotoxicité d'autres substances chimiques présentes (paragraphe 9). Il convient d'en tenir compte, ainsi que des préoccupations générales concernant les tests de sensibilisation in vitro lors de l'examen des mélanges décrits au paragraphe 9 de l'introduction générale.

6. Lors de l'étude de validation, un taux élevé de faux négatifs a été observé pour les anhydrides. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (9) ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique) et les pré-haptènes (substances activées par oxydation), peuvent eux aussi donner des résultats négatifs avec cette méthode. Il est à noter que, bien que les résultats négatifs obtenus avec de potentiels pré- ou pro-haptènes doivent être interprétés avec précaution, la méthode IL 8 Luc a permis d'identifier correctement 11/11 pré-haptènes, 6/6 pro-haptènes et 5/8 pré- ou pro-haptènes dans la base de données IL 8 Luc (5) (7). L'examen complet récemment mené sur trois méthodes sans expérimentation animale (DPRA, KeratinoSens™ et h-CLAT) pour l'identification des pré- et pro-haptènes (10) et le fait que les cellules THP G8 utilisées dans la méthode IL 8 Luc soient une lignée issue de la lignée THP 1 utilisée dans la méthode h-CLAT, permettent de conclure que la méthode IL 8 Luc, combinée avec d'autres méthodes, peut

contribuer à améliorer la sensibilité des méthodes sans expérimentation animale dans la détection des pré- et pro-haptènes. Les tensioactifs testés à ce jour ont généré des (faux) positifs, quel que soit leur type (cationique, anionique ou non-ionique). Pour finir, les produits chimiques qui interfèrent avec la luciférase peuvent masquer son activité ou en empêcher les mesures, ce qui peut résulter en une apparente inhibition ou une luminescence accrue (11). Par exemple, il a été rapporté que des concentrations en phyto-œstrogènes supérieures à 1 µM provoquent une interférence avec les signaux luminescents dans d'autres essais par gène rapporteur de la luciférase, à cause d'une sur-activation du gène rapporteur de la luciférase. Par conséquent, l'expression de la luciférase observée en présence d'une forte concentration de phyto-œstrogènes ou de composés suspectés d'activer le gène rapporteur de la luciférase de manière similaire doit être examinée avec précaution (12). En se basant sur les critères ci-dessus, les tensioactifs, les anhydrides et les produits chimiques qui interfèrent avec la luciférase sont exclus du champ d'application de la présente méthode. S'il est démontré que la méthode IL 8 Luc n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

7. Comme indiqué ci-dessus, la méthode IL8-Luc aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer si les résultats de la méthode IL8-Luc pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation dans le cadre d'une approche combinant d'autres sources d'information.

8. Les définitions et abréviations sont fournies aux Tableau 1 et Appendice I.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. La méthode d'essai IL 8 Luc utilise la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine, THP 1, obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). À partir de cette lignée THP 1, le département de dermatologie de l'école de médecine à l'université de Tohoku a développé la lignée THP G8 rapporteur IL 8, laquelle contient les gènes de la luciférase orange (Stable Luciferase Orange, SLO) et rouge (Stable Luciferase Red, SLR) placés sous le contrôle des promoteurs de IL 8 et de la Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), respectivement (2). Ce système permet de quantifier l'induction du gène de la luciférase en détectant la luminescence issue d'un substrat de luciférase connu pour son émission lumineuse, comme indicateur de l'activité de IL 8 et de la GAPDH dans les cellules à la suite de l'exposition à des produits chimiques sensibilisants. Le test bi-couleurs comprend une luciférase émettant dans l'orange (SLO issue de *Rhagophthalmus ohbai*, $\lambda_{\max} = 580$ nm) (13), marqueur de l'activation du promoteur IL 8, ainsi qu'une luciférase émettant dans le rouge (SLR issue de *Phrixothrix hirtus*, $\lambda_{\max} = 630$ nm) (14), marqueur de l'activation du promoteur interne témoin, GAPDH. Les deux luciférases émettent dans des couleurs différentes lorsqu'elles réagissent à la d-luciférine de luciole et leur luminescence est mesurée en parallèle, lors d'une réaction en une étape, en subdivisant la lumière émise dans le mélange d'essai à l'aide d'un filtre optique (15) (voir Appendice II). En outre, l'ARNm de la GAPDH est exprimé de manière ubiquitaire à des niveaux modérément abondants. Il est fréquemment utilisé comme contrôle endogène pour l'amplification en chaîne par polymérase quantitative et en temps réel dans certains systèmes expérimentaux, car son expression est constante à différents moments et après une manipulation expérimentale (16) (17) (18). L'inhibition de GAPLA (Inh-GAPLA) s'avère être un bon marqueur de la viabilité cellulaire, avec une forte corrélation avec les cellules excluant l'iodure de propidium (PI), un marqueur couramment utilisé pour déterminer la viabilité cellulaire par cytométrie de flux. Un Inh-GAPLA inférieur à 0,8 indique la cytotoxicité du produit chimique d'essai, ce qui

suggère à son tour que le produit chimique d'essai s'est dissous dans le milieu de culture. Le test peut donc être utilisé pour vérifier l'exposition à des produits chimiques peu solubles et pour réduire le nombre de résultats non concluants (8).

10. Les cellules THP G8 sont traitées pendant 16 heures avec le produit chimique d'essai, puis l'activité de la luciférase SLO (SLO-LA), marqueur de l'activité du promoteur IL 8, et l'activité de la luciférase SLR (SLR-LA), marqueur de l'activité du promoteur GAPDH, sont mesurées. Par souci de lisibilité, SLO-LA et SLR-LA sont respectivement appelées IL8LA et GAPLA. On trouvera au tableau 1 une description des termes associés à l'activité de la luciférase dans la méthode IL 8 Luc. Les valeurs mesurées sont utilisées pour calculer (i) l'IL8LA normalisée (nIL8LA), c'est-à-dire le ratio IL8LA/GAPLA ; (ii) l'induction de nIL8LA (Ind IL8LA), qui est le ratio de la moyenne arithmétique des quatre valeurs mesurées de nIL8LA des cellules THP G8 traitées avec le produit chimique d'essai, divisée par la moyenne des valeurs de nIL8LA des cellules THP G8 non traitées ; (iii) l'inhibition de GAPLA (Inh-GAPLA), qui est le ratio de la moyenne arithmétique des quatre valeurs mesurées de GAPLA des cellules THP G8 traitées avec le produit chimique d'essai, divisée par la moyenne des valeurs de GAPLA des cellules THP G8 non traitées. Inh-GAPLA est un marqueur de cytotoxicité.

Tableau 1 : Description des termes associés à l'activité de la luciférase dans la méthode IL-8 Luc

Abréviations	Définition
GAPLA	Activité de la luciférase rouge SLR indicative de l'activité du promoteur GAPDH
IL8LA	Activité de la luciférase orange SLO indicative de l'activité du promoteur IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA des cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques d'essai / nIL8LA des cellules non exposées
Inh-GAPLA	GAPLA des cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques d'essai / GAPLA des cellules non exposées
CV05	La plus faible concentration du produit chimique d'essai à laquelle Inh-GAPLA est < 0,05
Réduction du PI	% de cellules excluant le PI parmi les cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques d'essai / % de cellules excluant le PI parmi les cellules THP-G8 non exposées

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

11. Avant d'utiliser en routine la méthode décrite dans la présente annexe à la Ligne directrice 442E, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux neuf substances d'épreuve listées à l'appendice III et conformément aux Bonnes pratiques des méthodes in vitro (19). En outre, les utilisateurs de la méthode devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité, avec le témoin positif et avec le témoin de solvant/véhicule, et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité au cours du temps de la méthode d'essai au sein de leur laboratoire.

PROCÉDURE

12. Le mode opératoire de référence pour la méthode IL 8 Luc est disponible et doit être suivi lors de la mise en œuvre de la méthode d'essai (5). Les laboratoires souhaitant mener cet essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante THP G8 auprès du laboratoire Tottori Bioscience Promotion Organization, Tottori, Japon après signature d'un accord de transfert de matériel, en ligne avec les conditions énoncées dans le modèle d'accord de l'OCDE. Les paragraphes qui suivent fournissent une description des principaux composants et protocoles de l'essai.

Préparation des cellules

13. Il convient d'utiliser la lignée cellulaire THP G8 pour mener la méthode d'essai IL 8 Luc (voir paragraphes 9 et 12). À leur réception, les cellules sont repiquées (2-4 repiquages) et congelées pour être stockées en réserve homogène. Les cellules de cette réserve peuvent être repiquées jusqu'à six semaines, sans dépasser 12 repiquages. Le milieu de culture utilisé pour le repiquage est le RPMI-1640 contenant 10 % sérum bovin fœtal (SBF), une solution d'antibiotique/ antimycosique (100 U/mL pénicilline G, 100 µg/mL streptomycine et 0,25 µg/mL amphotéricine B dans une solution saline à 0,85 %) (GIBCO Cat#15240-062, par exemple), 0,15 µg/mL puromycine (CAS:58-58-2, par exemple) et 300 µg/mL G418 (CAS:108321-42-2, par exemple).

14. Avant utilisation des cellules pour l'essai, elles doivent être qualifiées par une vérification de réactivité. Cette vérification doit être effectuée une à deux semaines, ou 2 à 4 repiquages, après décongélation, avec comme témoin positif le bromure de 4-nitrobenzyle (4-NBB) (CAS:100-11-8, pureté ≥ 99 %) et comme témoin négatif l'acide lactique (CAS:50-21-5, pureté ≥ 85 %). Le 4-NBB doit générer une réponse positive pour Ind IL8LA (≥ 1,4), l'acide lactique doit générer une réponse négative pour Ind IL8LA (< 1,4). Si cette condition n'est pas remplie, il est recommandé d'utiliser un nouveau flacon de stock congelé et de révéifier la concentration de 4-NBB. Seules les cellules ayant réussi la vérification de réactivité sont utilisées pour l'essai. La vérification est réalisée suivant la procédure décrite aux paragraphes 21-23.

15. Pendant l'essai, les cellules THP G8 sontensemencées à une densité de 2 à 5 x 10⁵ cellules/mL, puis placées en pré-culture dans des flacons de culture pendant 48 à 96 heures. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et rincées avec du RPMI-1640 contenant 10 % SBF sans antibiotiques, puis suspendues à une densité de 1 x 10⁶ cellules/mL dans du RPMI-1640 contenant 10 % SBF sans antibiotiques. Les cellules sont enduites réparties dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Costar Cat#3603, par exemple) à raison de 50 µL par puits (5 x 10⁴ cellules/puits).

Préparation des produits testés et témoin

16. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Dans la méthode IL 8 Luc, les produits chimiques d'essai sont dissous dans du X VIVO™ 15, un milieu sans sérum, disponible dans le commerce (Lonza, 04-418Q), jusqu'à une concentration finale de 20 mg/mL. Le milieu X VIVO™ 15 est ajouté à 20 mg de produit chimique d'essai (quelle que soit la solubilité du produit chimique) dans un microtube, puis l'on complète pour atteindre un volume de 1 mL, le tube est mélangé vigoureusement et placé sur un mélangeur rotatif à une vitesse maximale de 8 rpm pendant 30 minutes à température ambiante (environ 20°C). De plus, si les produits chimiques solides restent insolubles, le tube est soumis à une sonication jusqu'à dissolution complète du produit chimique d'essai ou jusqu'à obtention d'une dispersion stable. Si les produits chimiques sont solubles dans le X VIVO™ 15, la solution est diluée suivant un facteur 5 dans du X VIVO™ 15 et utilisée comme solution de base des produits chimiques dans

le X VIVO™ 15 (4 mg/mL). Si les produits chimiques ne sont pas entièrement solubles à 20 mg/mL dans le X VIVO™ 15, le mélange est à nouveau mélangé par rotation pendant au moins 30 minutes, puis centrifugé à 15 000 rpm (\approx 20 000 g) pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est utilisé comme solution de base des produits chimiques dans le X VIVO™ 15. Si d'autres solvants sont utilisés, par exemple le DMSO, l'eau ou du milieu de culture, les raisons scientifiques de ce choix doivent être expliquées. La procédure détaillée de dilution des produits chimiques est fournie à l'appendice V. Les solutions de X VIVO™ 15 décrites aux paragraphes 17-22 sont mélangées à 1:1 (v/v) avec les cellules en suspensions préparées dans la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (voir paragraphe 15).

17. La première épreuve a pour but de déterminer la concentration cytotoxique et d'évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Une série de dilutions de facteur 2 des solutions de base des produits chimiques dans le X VIVO™ 15 est réalisée avec du X VIVO™ 15 (voir Appendice V), dans une plaque microtitre 96 puits (Costar Cat#EW-01729-03, par exemple). Ensuite, dans chaque puits d'une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, on ajoute 50 μ L de solution diluée à 50 μ L de cellules en suspension. En conséquence, pour les produits chimiques d'essai solubles dans le X VIVO™ 15, la concentration finale de produit chimique se situe dans une fourchette allant de 0,002 à 2 mg/mL (Appendice V). Pour les produits chimiques d'essai non solubles dans le X VIVO™ 15 à 20 mg/mL, seuls sont déterminés des facteurs de dilution allant de 2 à 210, bien que les concentrations finales réelles des produits chimiques d'essai restent approximatives et dépendent de la concentration de saturation des produits chimiques d'essai dans la solution de base X VIVO™ 15.

18. Dans les épreuves suivantes (réplicats deux, trois et quatre), la solution de base X VIVO™ 15 est préparée à une concentration quatre fois supérieure à la concentration de viabilité cellulaire 05 (CV05, la concentration la plus faible à laquelle $\text{Inh-GAPLA} < 0,05$) observée lors de la première épreuve. Si la valeur Inh-GAPLA ne baisse pas sous la limite de 0,05 à la plus haute concentration testée dans la première épreuve, la solution de base X VIVO™ 15 est préparée à la concentration la plus élevée de la première épreuve. La concentration CV05 est calculée en divisant la concentration de la solution de base de la première épreuve par le facteur de dilution de CV05 (X) nécessaire pour diluer la solution de base au point d'atteindre la valeur CV05 (voir Appendice V). Pour tester les substances non solubles dans le X VIVO™ à 20 mg/mL, la CV05 est déterminée par la concentration de la solution de base x 1/X. Pour les épreuves 2 à 4, une seconde solution de base est préparée à une concentration de 4 x CV50 (Appendice V).

19. Une série de dilutions des secondes solutions de base de X VIVO™ 15 est réalisée suivant un facteur 1,5 dans une plaque microtitre 96 puits. Ensuite, dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, on ajoute 50 μ L/puits de la solution diluée à 50 μ L/puits de suspension cellulaire. Chaque concentration de chaque produit chimique d'essai est testée dans 4 puits. Les échantillons sont ensuite mélangés sur un agitateur de plaques et incubés pendant 16 heures à 37°C, 5 % CO₂, puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite ci-dessous.

20. Le témoin de solvant est un mélange de 50 μ L/puits de X VIVO™ 15 et de 50 μ L/puits de suspension cellulaire dans du RPMI-1640 contenant 10 % SBF.

21. Le témoin positif recommandé est le 4-NBB. À 20 mg de 4-NBB placés dans un microtube de 1,5 mL, on ajoute du X VIVO™ 15 jusqu'à atteindre 1 mL. Le 4-NBB n'étant pas entièrement soluble à 20 mg/mL dans le X VIVO™ 15, le tube est mélangé vigoureusement et placé sur un mélangeur rotatif à une vitesse maximale de 8 rpm pendant au minimum 30 minutes, puis centrifugé à 20 000 g pendant 5 minutes (voir paragraphe 16). Le surnageant obtenu est dilué suivant un facteur 4 dans le X VIVO™ 15, puis 500 μ L du surnageant dilué sont transférés dans un puits sur une plaque microtitre 96 puits. Le surnageant

dilué est à nouveau dilué dans du X VIVO™ 15 suivant des facteurs 2 et 4, puis on ajoute 50 µL des solutions à 50 µL de cellules THP G8 en suspension dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Appendice VI). Chaque concentration du témoin positif est testée dans 4 puits. La plaque microtitre est agitée sur un agitateur de microplaques et incubée dans un incubateur à CO₂ pendant 16 heures (37°C, 5 % CO₂), puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite au paragraphe 28.

22. Le témoin négatif recommandé est l'acide lactique. À 20 mg d'acide lactique placés dans un microtube de 1,5 mL, on ajoute du X VIVO™ 15 (20 mg/mL) jusqu'à atteindre 1 mL. On dilue la solution d'acide lactique à 20 mg/mL suivant un facteur 5 dans du X VIVO™ 15 (4 mg/mL), puis 500 µL de cette solution d'acide lactique à 4 mg/mL sont transférés dans un puits sur une plaque microtitre 96 puits. Cette solution est diluée suivant un facteur 2 dans du X VIVO™ 15, puis re-diluée suivant un facteur 2 pour produire des solutions à 2 mg/mL et 1 mg/mL. On ajoute 50 µL de ces trois solutions et de témoin de véhicule (X VIVO™ 15) à 50 µL de cellules THP G8 en suspension dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat. Chaque concentration du témoin négatif est testée dans 4 puits. La plaque microtitre est agitée sur un agitateur de microplaques et incubée dans un incubateur à CO₂ pendant 16 heures (37 °C, 5 % CO₂), puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite au paragraphe 28.

23. D'autres témoins positifs ou négatifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves.

24. Des précautions doivent être prises contre l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles et pour éviter toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple).

25. Pour établir une prédiction positive ou négative, il faut avoir testé les produits chimiques d'essai et le témoin de solvant dans 2 à 4 épreuves (voir Tableau 2). Les épreuves sont réalisées en plusieurs jours distincts, avec des solutions de base des produits chimiques dans le X VIVO™ 15 fraîches et des cellules récoltées séparément. Les cellules peuvent être issues du même repiquage.

Mesure de l'activité de la luciférase

26. La luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre pour microplaques 96 puits équipé de filtres optiques, par exemple les séries Phelios (ATTO, Tokyo, Japon), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Allemagne) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Le luminomètre doit être étalonné pour chaque essai, afin de garantir une bonne reproductibilité des mesures. Des luciférases recombinantes orange et rouge sont disponibles pour effectuer l'étalonnage.

27. On transfère 100 µL de réactif pré-chauffé Tripluc® Luciférase (Tripluc) dans chaque puits de la plaque microtitre qui contient la suspension cellulaire traitée avec ou sans produit chimique d'essai. La plaque est agitée pendant 10 minutes à température ambiante (environ 20°C) avant d'être placée dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 secondes sans filtre optique (F0), puis 3 secondes avec filtre optique (F1). Le recours à d'autres réglages doit être justifié, par exemple pour s'adapter au modèle de luminomètre utilisé.

28. Pour chaque concentration, les paramètres sont calculés à partir des valeurs mesurées, par exemple IL8LA, GAPLA, nIL8La, Ind IL8LA, Inh-GAPLA, la moyenne avec écart type pour IL8LA, la moyenne avec écart type pour GAPLA, la moyenne avec écart type pour nIL8LA, la moyenne avec écart type pour Ind IL8LA, la moyenne avec écart type pour Inh-GAPLA et l'intervalle de confiance à 95 % pour

Ind IL8LA. Les définitions des paramètres utilisés dans le présent paragraphe sont fournies aux Appendices I et IV, respectivement.

29. Avant de procéder aux mesures dans un essai à rapporteur multi-couleurs, il convient de réaliser un discernement des couleurs, généralement à l'aide de détecteurs (luminomètre et lecteur de plaque) équipés de filtres optiques tels que des filtres coupe-bande (filtres passe-haut ou passe-bas) ou des filtres passe-bande. Il convient d'étalonner les coefficients de transmission des filtres pour chaque signal coloré bioluminescent avant l'essai, voir Appendice II.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

30. Pour émettre une prédiction positive ou négative, les critères à respecter dans chaque épreuve de la méthode IL 8 Luc sont les suivants :

- une prédiction avec la méthode IL 8 Luc est considérée comme positive si un produit chimique d'essai présente une valeur Ind IL8LA $\geq 1,4$ et si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind IL8LA est $\leq 1,0$
- une prédiction avec la méthode IL 8 Luc est considérée comme négative si un produit chimique d'essai présente une valeur Ind IL8LA $< 1,4$ et/ou si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind IL8LA est $< 1,0$

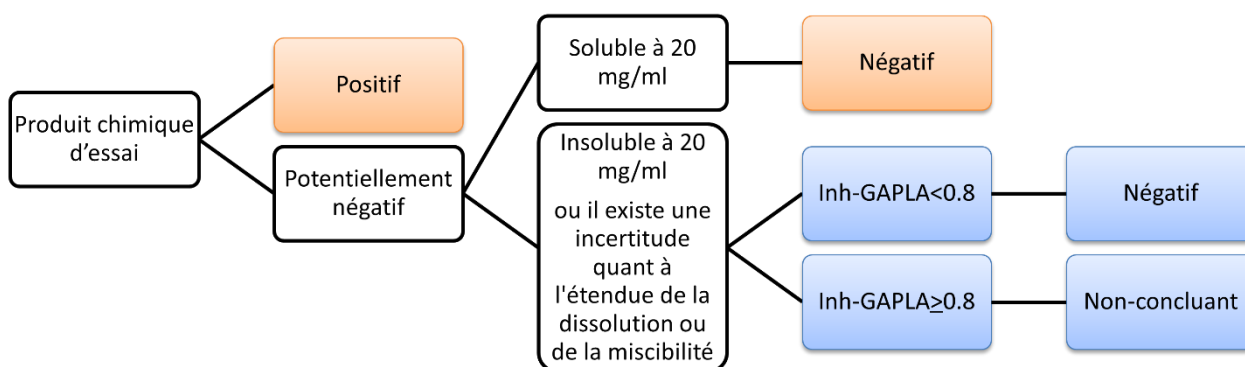
Modèle prédictif

31. Les produits chimiques d'essai pour lesquels deux résultats sont positifs parmi les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} épreuves sont considérés comme positifs, tandis que ceux pour lesquels trois résultats sont négatifs parmi les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} épreuves sont considérés comme potentiellement négatifs (Tableau 2). Parmi les produits chimiques d'essai potentiellement négatifs, ceux dissous à 20 mg/mL dans le X VIVO™ 15 sont considérés comme négatifs. Si les produits chimiques d'essai ne sont pas dissous à 20 mg/mL dans le X VIVO™ 15, ou s'il existe une incertitude quant à l'étendue de la dissolution ou de la miscibilité, les produits chimiques d'essai dont l'Inh-GAPLA est inférieur à 0,8 sont jugés négatifs, tandis que ceux dont l'Inh-GAPLA est supérieur ou égal à 0,8 ne sont pas considérés (Figure 1).

Tableau 2 : critères d'identification des produits positifs et potentiellement négatifs

Epreuve 1	Epreuve 2	Epreuve 3	Epreuve 4	Prédiction finale
Positif	Positif	-	-	Positif
Positif	Négatif	Positif	-	Positif
Positif	Négatif	Négatif	Positif	Positif
Positif	Négatif	Négatif	Négatif	Potentiellement négatif
Négatif	Positif	Positif	-	Positif e
Négatif	Positif	Négatif	Positif	Positif
Négatif	Positif	Négatif	Négatif	Potentiellement négatif
Négatif	Négatif	Positif	Positif	Positif
Négatif	Négatif	Positif	Négatif	Potentiellement négatif
Négatif	Négatif	Négatif	-	Potentiellement négatif

Figure 1 : modèle prédictif pour la décision finale



Critères d'acceptabilité

32. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lorsque l'essai IL 8 Luc est mené :
- la valeur Ind IL8LA doit être de 5,0 au minimum à au moins une concentration du témoin positif, 4-NBB, pour chaque essai ;
 - la valeur Ind IL8LA doit être de 1,4 au maximum à toutes les concentrations du témoin négatif, l'acide lactique, pour chaque essai ;

- il n'est pas tenu compte des données issues de plaques pour lesquelles la valeur GAPLA des puits témoin, contenant des cellules et du Tripluc mais pas de produit chimique d'essai, est inférieure à 5 fois la valeur GAPLA des puits contenant le milieu d'essai seul et du Tripluc ;
- il n'est pas tenu compte des données issues de plaques pour lesquelles la valeur Inh-GAPLA à toutes les concentrations du produit chimique d'essai est inférieure à 0,05 ; dans ce cas, l'essai initial est reproduit de telle sorte que la concentration finale la plus élevée dans le nouvel essai soit la plus basse concentration finale de l'essai précédent.

Rapport d'essai

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

Produits chimiques d'essai

- Substance mono-constituant :

- Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
- Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, 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) ;
- Solubilité dans le X VIVO™ 15. Pour les produits chimiques insolubles dans le X VIVO™ 15, indiquer si un précipité ou une flottation sont observés après centrifugation ;
- Concentration(s) testée(s) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si le X VIVO™ 15 n'a pas été utilisé.

- 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) ;
- Solubilité dans le X VIVO™ 15. Pour les produits chimiques insolubles dans le X VIVO™ 15, indiquer si un précipité ou une flottation sont observés après centrifugation ;
- Concentration(s) testée(s) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si le X VIVO™ 15 n'a pas été utilisé.

Témoins

- Témoin positif :

- Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants ;
- Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles et s'il y a lieu ;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
- Concentration(s) testée(s) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

- Témoin négatif :

- Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'application de la méthode d'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- Description de la méthode d'essai utilisée ;

- Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et origine (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple) ;
- Numéro de lot et origine du SBF, nom du fournisseur, numéro de lot de la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, numéro de lot du réactif Tripluc ;
- Nombre de repiquages et densité cellulaire au moment de l'essai ;
- Méthode de numération cellulaire utilisé pour l'ensemencement avant l'essai et mesures mises en oeuvre pour garantir une répartition homogène des cellules ;
- Luminomètre utilisé (modèle, par exemple), y compris réglages de l'instrument, substrat de luciférase utilisé, démonstration de l'adéquation des mesures de luminescence avec les témoins décrits à l'Appendice II ;
- Procédure suivie pour la démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour la démonstration de la reproductibilité des performances dans le temps dans l'application de la méthode d'essai.

Mode opératoire

- Nombre de réplicats et d'épreuves ;
- Concentration des produits chimiques d'essai, procédure d'application et durée d'exposition (si celles-ci diffèrent des recommandations) ;
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués ;
- Description de l'ÉTUDE sur les critères d'acceptabilité utilisée ;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

- Mesures de IL8LA et GAPLA ;
- Calculs de nIL8LA, Ind IL8LA et Inh-GAPLA ;
- Intervalle de confiance à 95 % pour Ind IL8LA ;
- Graphique présentant les courbes dose-effet pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité ;
- Description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- Discussion des résultats obtenus avec l'essai IL 8 Luc ;
- Examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

1. Toebak, M.J., Pohlmann, P.R., Sampat-Sardjoepersad, S.C., von Blomberg, B.M., Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., Rustemeyer, T., Gibbs, S. (2006), CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol In Vitro* 20, 117-124, 10.1016/j.tiv.2005.06.039
2. Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., et al. (2011), An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124: 359-369, 10.1093/toxsci/kfr237
3. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., et al. (2015), Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29: 1816-1830, 10.1016/j.tiv.2015.07.006
4. Kimura, Y., Watanabe, M., Suzuki, N., et al. (2018), The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). *J Toxicol Sci* 43: 741-749, 10.2131/jts.43.741
5. OECD (2023), Draft – Second edition of the Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
6. OECD (2017), Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, [ENV/JM/MONO\(2017\)20](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
7. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., et al. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71: 337-351, 10.1016/j.yrtph.2014.12.008
8. Kimura, Y., Fujimura, C., Aiba, S. (2021), The modified IL-8 Luc assay, an in vitro skin sensitisation test, can significantly improve the false-negative judgment of lipophilic sensitizers with logKow values > 3.5. *Arch Toxicol* 95: 749-758, 10.1007/s00204-020-02934-9
9. Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., et al. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 38: 275-284
10. Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D.A., et al. (2016), Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol* 82: 147-155, 10.1016/j.yrtph.2016.08.007
11. Thorne, N., Inglese, J., Auld, D.S. (2010), Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17: 646-657, 10.1016/j.chembiol.2010.05.012

12. OECD (2016), Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>,
13. Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., et al. (2001), Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1286-1291, 10.1006/bbrc.2001.4254
14. Viviani, V.R., Bechara, E.J., Ohmiya, Y. (1999), Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271-8279, 10.1021/bi9900830
15. Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., et al. (2005), Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38: 891-894, 05386ST03 [pii]
16. Edwards, D.R., Denhardt, D.T. (1985), A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 157: 127-143,
17. Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., et al. (2008), Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68: 1555-1560, 10.1002/pros.20815
18. Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., et al. (1999), Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270: 41-49, 10.1006/abio.1999.4085
19. OECD (2018), Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment, No. 286, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>
20. United Nations (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978- 92-1-117006-1. Available at:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

APPENDICE I : DÉFINITIONS

AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables) : séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable in vivo, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire.

Cellules excluant l'iodure de propidium (PI) : Le marqueur fluorescent iodure de propidium (PI) n'est pas absorbé par les cellules vivantes. Par conséquent, dans la coloration par fluorescence et la cytométrie de flux, les cellules qui ne sont pas colorées par le PI sont considérées comme des cellules vivantes et les cellules qui sont colorées sont considérées comme des cellules mortes.

CV05 : viabilité cellulaire 05. Concentration minimum à laquelle les produits chimiques génèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0,05.

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

Épreuve : consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

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

FlnSLO-LA : abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL 8 Luc, faisant référence à Ind IL8LA. Voir définition de Ind IL8LA.

GAPLA : activité de la luciférase rouge Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), sous régulation du promoteur de GAPDH, qui démontre la viabilité cellulaire et le nombre de cellules viables.

IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment, approches intégrées 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'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

II-SLR-LA : abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL 8 Luc, faisant référence à Inh-GAPLA. Voir définition de Inh-GAPLA.

IL 8 (Interleukine-8) : cytokine issue des cellules endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, macrophages et monocytes qui provoque la chimiotaxie des neutrophiles et des lymphocytes T.

IL8LA : activité de la luciférase orange Stable Luciferase Orange (SLO) ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$), sous régulation du promoteur de IL 8.

Ind IL8LA : variation d'induction d'IL8LA. Calculée en divisant la valeur nIL8LA des cellules THP G8 traitées avec les produits chimiques par la valeur nIL8LA des cellules THP G8 non stimulées, elle représente l'induction du promoteur IL 8 par les produits chimiques.

Inh-GAPLA : inhibition de GAPLA. Calculée en divisant la valeur GAPLA des cellules THP G8 traitées avec les produits chimiques par la valeur GAPLA des cellules THP G8 non stimulées, elle représente la cytotoxicité des produits chimiques.

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

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.

nIL8LA : l'activité de SLO qui reflète l'activité du promoteur IL 8 (IL8LA) normalisée par l'activité de la SLR qui reflète l'activité du promoteur GAPDH (GALPA). Elle représente l'activité du promoteur IL 8 rapportée à la viabilité cellulaire ou au nombre de cellules.

nSLO-LA : abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL 8 Luc, faisant référence à nIL8LA. Voir définition de nIL8LA.

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

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

Précision : étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa « pertinence ». Ce terme est souvent utilisé au sens de « concordance », pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique d'essai : le terme « 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.

Sensibilité : proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par le test. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

Seuil minimum d'induction (MIT) : la concentration minimum à laquelle un produit chimique remplit le critère de positivité.

SLO-LA : abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL 8 Luc, faisant référence à IL8LA. Voir définition de IL8LA.

SLR-LA : abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL 8 Luc, faisant référence à GAPLA. Voir définition de GAPLA.

Spécificité : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

Substance : élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute

impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance.

Substance mono-constituant : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

Témoin de solvant/véhicule : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant /véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin positif : réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Tensioactif : aussi appelé agent de surface, substance, par exemple un détergent, qui réduit la tension de surface d'un liquide et lui permet ainsi de former une mousse ou de pénétrer dans des solides. Aussi appelé agent mouillant. (TG437)

THP G8 : lignée cellulaire rapporteur IL 8 utilisée dans l'essai IL 8 Luc. La lignée monocyttaire humaine THP 1 a été transfectée avec les gènes de la luciférase SLO et SLR sous le contrôle des promoteurs IL 8 et GAPDH, respectivement.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques) : 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.

UVCB : substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.

APPENDICE II : PRINCIPES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA LUCIFÉRASE ET DÉTERMINATION DES COEFFICIENTS DE TRANSMISSION DES FILTRES OPTIQUES POUR SLO ET SLR

Le système d'essai à rapporteur multiple – Tripluc – peut être utilisé avec un luminomètre à microplaque doté d'un système de détection multi-couleurs avec filtre optique (Phelios AB-2350 [ATTO], ARVO [PerkinElmer] ou Tristar LB941 [Berthold], par exemple). Le filtre optique utilisé pour les mesures est un filtre passe-haut ou passe-bas 600-620 nm, ou un filtre passe-bande 600-700 nm.

(1) Mesure de deux couleurs de luciférase avec un filtre optique.

L'exemple ci-dessous est réalisé avec un appareil Phelios AB-2350 (ATTO). Le luminomètre est équipé d'un filtre passe-haut 600 nm (R60 HOYA Co.) (filtre 1) pour séparer la luminescence SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) de la luminescence SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Afin d'établir les coefficients de transmission du filtre passe-haut 600 nm, il convient d'abord d'utiliser des enzymes luciférases SLO et SLR purifiées pour i) mesurer l'intensité de la bioluminescence SLO et SLR en l'absence de filtre (F0), ii) mesurer l'intensité de bioluminescence de SLO et SLR qui traverse le filtre 1 (passe-haut 600 nm) et iii) calculer les coefficients de transmission du filtre 1 (600 nm) pour SLO et SLR présentés ci-dessous.

Coefficients de transmission		Abréviation	Définition
SLO	Filtre 1 coefficients de transmission	κO_{R60}	Coefficient de transmission du filtre pour SLO
SLR	Filtre 1 coefficients de transmission	κR_{R60}	Coefficient de transmission du filtre pour SLR

Si l'intensité de SLO et SLR dans l'échantillon testé sont appelées O et R, respectivement, alors i) l'intensité lumineuse sans filtre (tout optique) F0 et ii) l'intensité lumineuse transmise à travers le filtre 1 (600 nm) F1 sont décrites ci-dessous.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Ces formules peuvent être expliquées comme suit :

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Ensuite, à partir des coefficients de transmission calculés (κO_{R60} et κR_{R60}) et des valeurs F0 et F1 calculées, il est possible de trouver les valeurs O et R selon le calcul ci-après :

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Matériel et méthode de détermination des coefficients de transmission

(1) Réactifs

- Enzymes de luciférase purifiées :

Enzyme SLO purifiée lyophilisée

Enzyme SLR purifiée lyophilisée

(dans l'étude de validation, les enzymes ont été acquises auprès de Tottori Bioscience Promotion Organization, Tottori, Japon, de même que la lignée cellulaire THP-G8)

- Réactif :

Réactif Tripluc® Luciférase (obtenu par exemple auprès de TOYOBO Cat#MRA-301)

- Milieu : pour le test de luciférase (30 ml, stocké à 2 - 8°C)

Réactif	Concentration	Concentration finale dans le milieu	Volume nécessaire
RPMI-1640	-	-	27 ml
SBF	-	10 %	3 ml

(2) Préparation des solutions enzymatiques

Dissoudre les enzymes purifiées lyophilisées de luciférase dans un tube en ajoutant 200 µL de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) supplémenté avec 10 % (m/v) glycérol, subdiviser la solution enzymatique en aliquotes en 10 µL dans des tubes jetables de 1,5 mL et stocker les tubes congelés à -80°C. Les solutions enzymatiques congelées peuvent être utilisées pendant au maximum six

mois. Pour utiliser les solutions, ajouter 1 ml du milieu de l'essai de luciférase (RPMI-1640 avec 10 % SBF) à chaque tube de solution enzymatique (solution diluée) et maintenir les tubes sur la glace pour éviter toute désactivation.

(3) Mesure de la bioluminescence

Décongeler le réactif de l'essai de luciférase Tripluc® (Tripluc) et le maintenir à température ambiante dans un bain marie ou sur la paillasse. Allumer le luminomètre 30 minutes avant le début des mesures, afin de permettre au photomultiplicateur de se stabiliser. Transférer 100 µL de la solution enzymatique diluée dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (échantillon de référence SLO en #B1, #B2, #B3, échantillon de référence SLR en #D1, #D2, #D3). Transférer ensuite 100 µL de Tripluc préchauffé dans chaque puits de la plaque contenant la solution enzymatique diluée à l'aide d'une pipette automatique. Agiter la plaque pendant 10 minutes à température ambiante (environ 25°C) sur un agitateur de plaque. Éliminer les bulles qui pourraient se former dans les solutions. Placer la plaque dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 secondes en l'absence de filtre optique (F0) et 3 secondes avec filtre optique (F1).

Les coefficients de transmission du filtre optique sont calculés comme suit :

Coefficient de transmission (SLO (κ_{OR60}))= (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

Coefficient de transmission (SLR (κ_{R60}))= (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Les facteurs de transmission calculés sont utilisés pour toutes les mesures réalisées avec le même luminomètre.

Contrôle de la qualité du matériel

Il convient de suivre la procédure décrite dans le mode opératoire IL-8 Luc (5).

APPENDICE III : SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente annexe de la Ligne directrice 442E, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec l'essai IL-8 Luc pour les 9 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 9 (substances retenues pour représenter l'éventail de réponses possibles au danger de sensibilisation cutanée). Les autres critères étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence *in vivo* et de données *in vitro* de grande qualité générées avec la méthode IL-8 Luc. Des données de référence publiées pour la méthode IL-8 Luc sont par ailleurs disponibles (1) (6).

Tableau 1 : substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode IL-8 Luc

Substances d'épreuve de compétence	de	N°CAS	État	Solubilité dans le X-VIVO15 à 20 mg/mL	Prédiction <i>in vivo</i> ¹	Prédiction IL-8 Luc ²	Plage de référence (µg/mL) ³	
							CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-Dinitrochlorobenzène		97-00-7	Solide	Insoluble ⁶	Sensibilisant (extrême)	Positif	2.3-3.9	0.5-2.3
Formaldéhyde		50-00-0	Liquide	Soluble	Sensibilisant (fort)	Positif	9-30	4-9
Mercapto-2-benzothiazole		149-30-4	Solide	Insoluble ⁶	Sensibilisant (modéré)	Positif	250-290	60-250
Éthylènediamine		107-15-3	Liquide	Soluble	Sensibilisant (modéré)	Positif	500-700	0.1-0.4
Ethylèneglycol diméthacrylate		97-90-5	Liquide	Insoluble ⁶	Sensibilisant (faible)	Positif	> 2000	0.04-0.1
Citral		5392-40-5	Liquide	Insoluble ⁶	Sensibilisant (faible)	Positif	12-30	4-12
Sulphate de Streptomycine		3810-74-0	Solide	Soluble	Non-sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000
Glycérol		56-81-5	Liquide	Soluble	Non-sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000
Isopropanol		67-63-0	Liquide	Soluble	Non-sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000

Abréviations : N°CAS = Numéro d'enregistrement au *Chemical Abstracts Service*

¹La puissance *in vivo* est obtenue d'après les critères proposés par l'ECETOC (20).

² Basée sur les valeurs historiques observées (2) (9).

³ Les valeurs CV05 et IL-8 Luc MIT ont été calculées à partir de l'hydrosolubilité indiquée par le logiciel EPI Suite™.

⁴ CV05 : concentration minimum à laquelle les produits chimiques génèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0,05.

⁵ MIT : concentration la plus faible à laquelle un produit chimique répond aux critères de positivité.

⁶ Insoluble ou pas entièrement soluble

APPENDICE IV : INDICES ET CRITÈRES DE JUGEMENT

nIL8LA (nSLO-LA)

Les réplicats j ($j = 1$ à 4) des concentrations i ($i = 0$ à 11) sont mesurées pour IL8LA (SLO-LA) et pour GAPLA (SLR-LA), respectivement. La valeur IL8LA normalisée, appelée nIL8LA (nSLO-LA), est définie comme suit :

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}.$$

Il s'agit de l'unité de mesure de base pour cet essai.

Ind-IL8LA (FinSLO-LA)

La hausse moyenne de la valeur nIL8LA (nSLO-LA) pour le réplicat à une concentration i par rapport à la concentration 0, Ind-IL8LA, est la mesure principale de l'essai. Le calcul du ratio s'effectue grâce à la formule qui suit :

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}.$$

Le laboratoire principal suggère de retenir une valeur de 1,4 comme seuil de positivité pour le produit chimique d'essai. Cette valeur s'appuie sur l'étude des données historiques du laboratoire principal. L'équipe de gestion des données a ensuite utilisé cette valeur dans toutes les phases de l'étude de validation. Le principal résultat, Ind-IL8LA, est le ratio de deux moyennes arithmétiques comme détaillé dans l'équation.

Intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %)

La précision de mesure du résultat principal est estimée grâce à l'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) du ratio. Le seuil inférieur de l'IC 95 % ≥ 1 indique que la valeur nIL8LA à l'une des concentrations i est significativement supérieure à la valeur obtenue avec le témoin de solvant. L'IC 95 % peut être calculé de plusieurs manières. Dans la présente étude, la méthode dite du théorème de Fieller a été utilisée. Selon ce théorème, l'intervalle de confiance à 95 % est calculé comme suit :

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

où $A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$, $B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$, $C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}$, et $n_0 = 4$,

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \left\{ 1/(n_0 - 1) \right\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{y_i} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{y_i}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{y_i}^2 = \left\{ 1/(n_{y_i} - 1) \right\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ est le rang centile 97,5 dans la distribution centrée de Student, avec le v du degré

de liberté, où $v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / (n_{y_i} - 1) \right\}$.

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

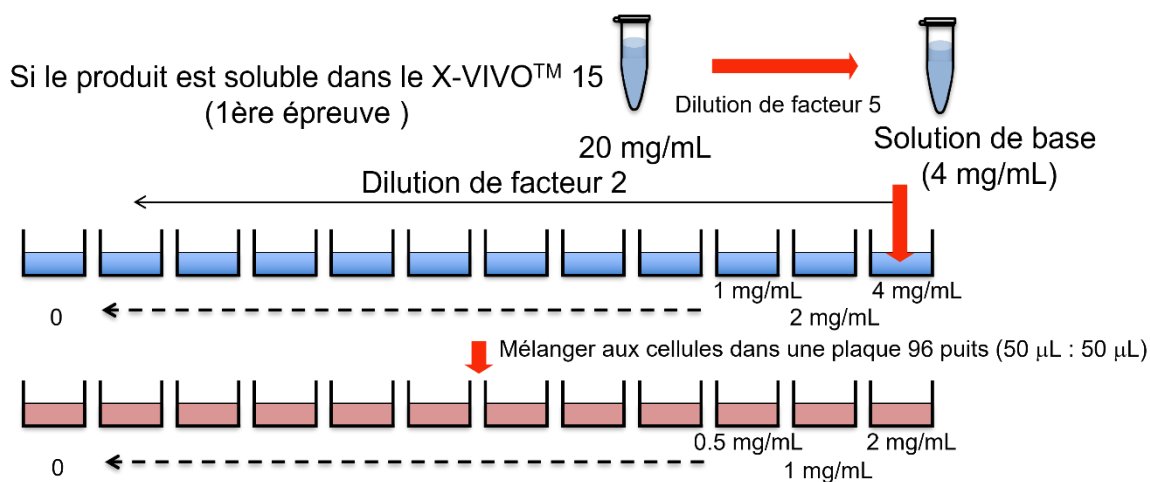
La valeur Inh-GAPLA est le ratio de la valeur GAPLA moyenne (SLR-LA) pour le réplicat à une concentration i comparée à la valeur obtenue avec le témoin de solvant, calculée suivant l'équation ci-après

$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{0j} \right\}.$$

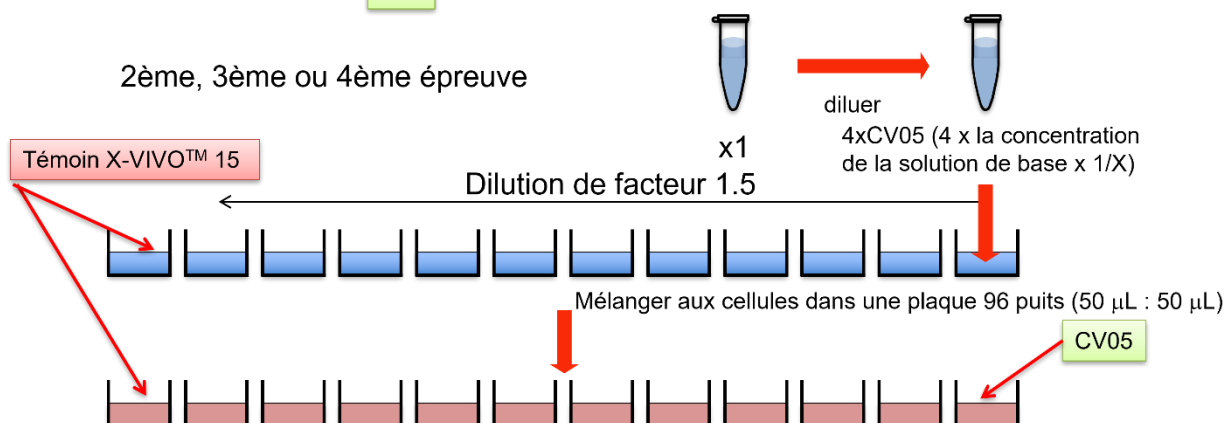
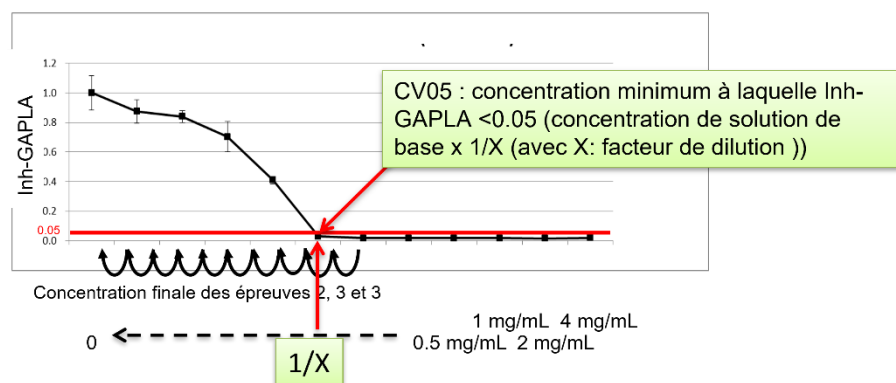
La valeur GAPLA étant placée en dénominateur du calcul de nIL8LA, si GAPLA est très faible, la variation de nIL8LA est très grande. En conséquence, les valeurs Ind-IL8LA pour une très faible valeur Inh-GAPLA (inférieure à 0,05) doivent être considérée comme peu précises.

APPENDICE V : SCHÉMA DU MODE OPÉRATOIRE POUR LA DISSOLUTION DES PRODUITS CHIMIQUES DE L'ESSAI IL-8 LUC.

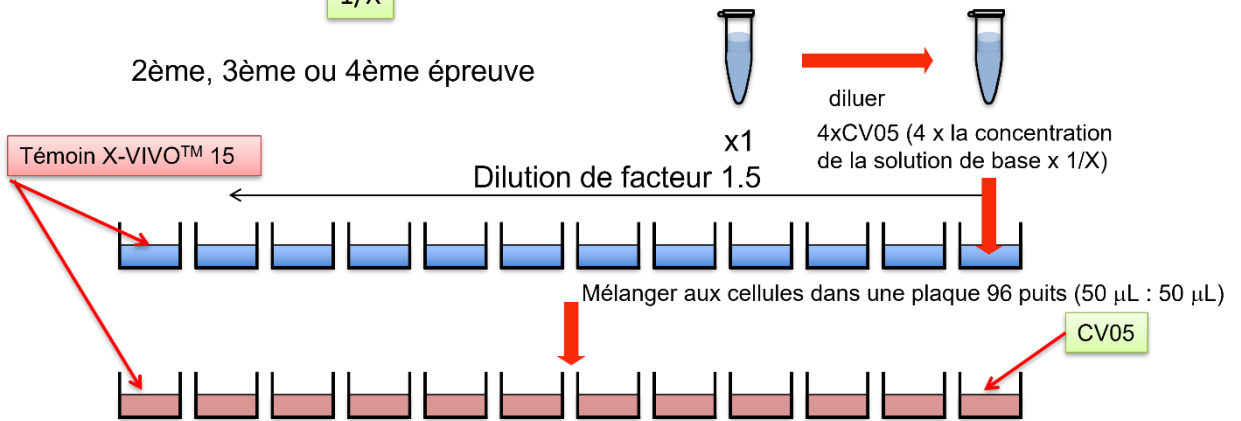
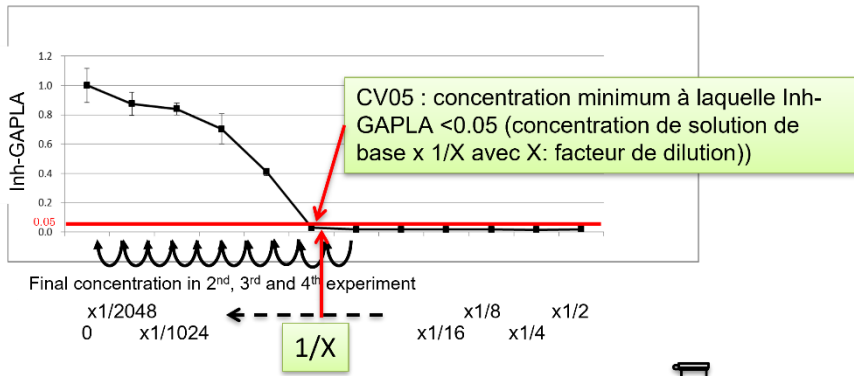
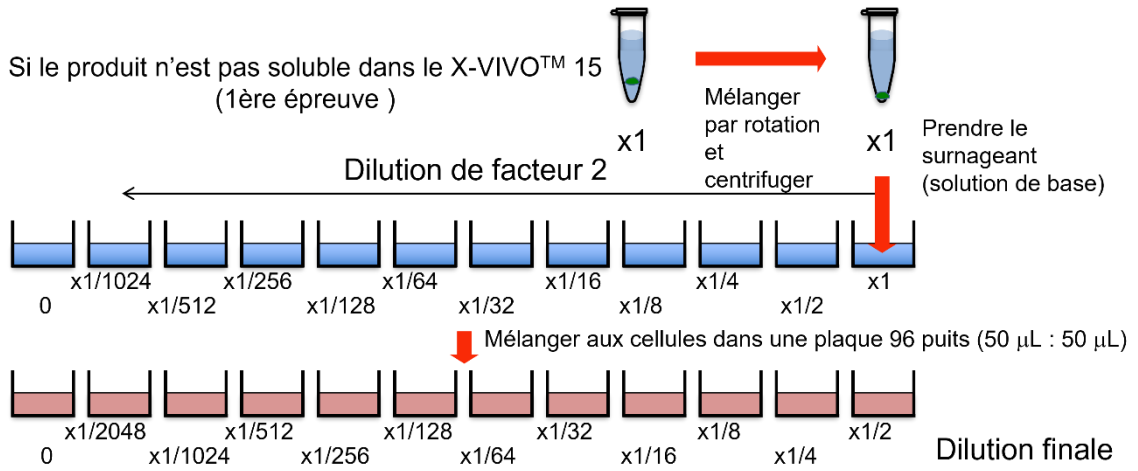
(a) Pour les produits chimiques dissous dans le X-VIVO™ 15 à 20 mg/mL



Déterminer la concentration maximum pour les épreuves suivantes



(b) Pour les produits chimiques non dissous¹ dans le X-VIVO™ 15 à 20 mg/mL

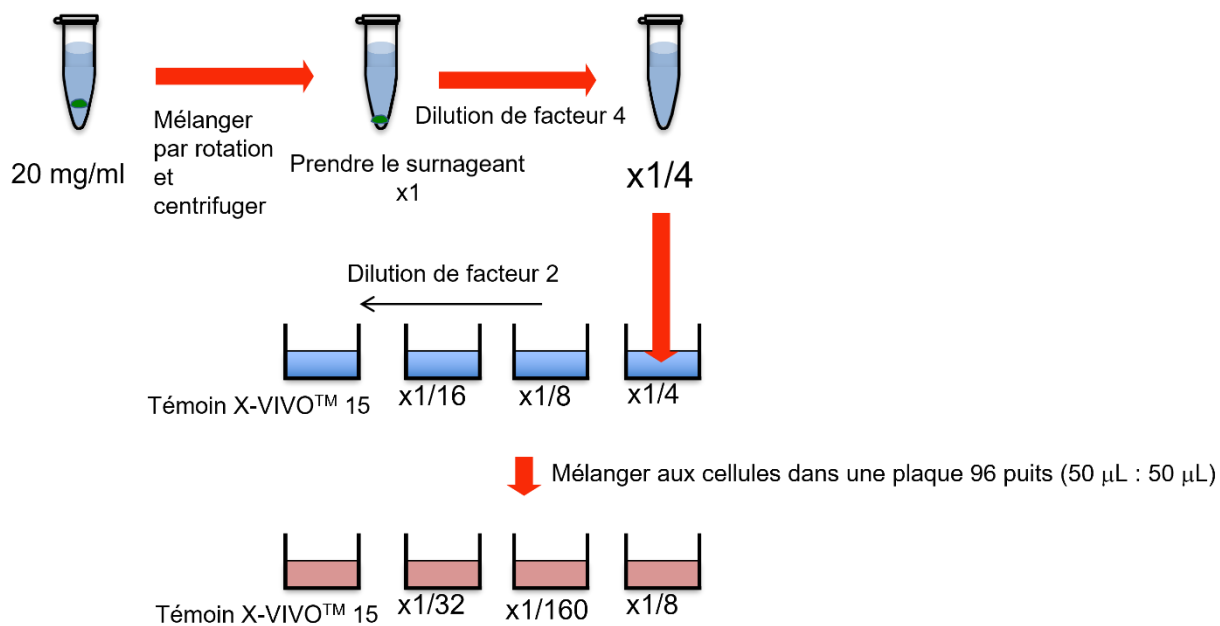


¹ Insoluble ou pas entièrement soluble

APPENDICE VI

Schéma de la méthode de dissolution du 4-NBB pour le témoin positif de l'essai IL-8 Luc.

Témoin positif : 4-NBB (pas entièrement soluble dans X-VIVO™ 15)



ANNEXE IV : SENSIBILISATION CUTANÉE IN VITRO : DÉTECTION GÉNOMIQUE RAPIDE DES ALLERGÈNES (GARD™) POUR L'ÉVALUATION DES SENSIBILISANTS CUTANÉS (GARD™skin)

Remarques préliminaires et limites

1. La méthode GARD™skin permet l'identification binaire du danger de sensibilisation cutanée (sensibilisants cutanés de la catégorie 1 du SGH de l'ONU par opposition aux non-sensibilisants). Elle consiste à évaluer les schémas de transcription d'une signature de biomarqueur génomique propre à cet effet mesuré, appelée signature de prédiction génomique (SPG) GARDskin, dans la lignée cellulaire SenzaCell™ (1) (2), un sous-clone de la lignée cellulaire de leucémie myéloïde MUTZ-3 (2-4), exposée à des produits chimiques d'essai.
2. La SPG GARDskin (n gènes= 196) a été identifiée grâce à l'analyse, axée sur les données, à l'échelle du génome, d'un ensemble de données de découverte reposant sur la lignée cellulaire SenzaCell de substitution aux cellules dendritiques humaines, exposée à un panel de sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU) (N = 20) et de non-sensibilisants (N = 20) bien caractérisés (6). Le SPG suit les événements mécanistiques associés avec la reconnaissance xénobiotique, la génération de signaux de danger immunologiques et d'activation de cellules dendritiques, tels que décrits par l'événement clé 3 de l'AOP de l'OCDE. Il est à noter que certains événements clés associés avec la SPG GARDskin peuvent aussi être associés avec d'autres événements clés, quoique dans une lignée cellulaire dérivée de cellules dendritiques. Pour de plus amples détails sur l'origine et les fonctions biologiques de la SPG, il convient de se référer au *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (7). L'utilisation potentielle de la SPG GARDskin dans un essai prédictif a été proposée (8), et sa fonctionnalité a été démontrée dans une application GARDskin basée sur la plateforme de biopuces GeneChip® (9). À la suite de l'évaluation d'autres plateformes technologiques pour l'analyse ciblée de l'expression génique (10), GARDskin a été transférée au format du système NanoString nCounter® (11), sur lequel il a été prouvé que sa performance prédictive était maintenue et l'efficacité des ressources améliorée (12).
3. La méthode GARDskin a fait l'objet d'une étude de validation (13) (14) coordonnée par SenzaGen AB, qui a été suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (15). Après analyse des preuves disponibles,

l'utilisation de la méthode GARDskin a été recommandée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification des dangers et d'étiquetage.

4. Outre un examen des données produites dans le contexte de l'essai circulaire, l'ESAC a également réalisé une étude approfondie du pipeline d'analyse GARDskin complet et de ses éléments bioinformatiques, tels qu'hébergés dans l'application d'analyse des données GARD (GDAA) et décrits dans le *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (7). L'ESAC a pu reproduire l'algorithme de prédiction à partir de l'ensemble de données d'entraînement et vérifier et reproduire toutes les étapes, des données brutes aux classifications finales des produits chimiques d'essai (15).

5. Il a été démontré que la méthode GARDskin est transférable à des laboratoires expérimentés dans l'utilisation en routine des techniques de culture cellulaire et de biologie moléculaire, notamment la cytométrie en flux et l'isolement de l'ARN (produits chimiques d'essai : N = 28). Les niveaux de reproductibilité intralaboratoire de la méthode GARDskin obtenus lors de l'essai circulaire de validation se situent entre 78.6 et 89.2 % en tenant compte de la concordance des points de données manquants² et entre 82.1 et 88.9 % en excluant les points de données manquants. De même, une estimation de la reproductibilité interlaboratoire a été calculée à 82.1 % en tenant compte de la concordance des points de données manquants et à 92.0 % en excluant les points de données manquants (13) (14) (15).

6. Dans l'ensemble, les résultats obtenus lors de l'étude de validation (13)(14) ont indiqué que, par comparaison avec un ensemble de données de référence de classification reposant sur un jugement d'expert, en se fondant sur une analyse du poids de la preuve intégrant des sources de données humaines (16) et ELGL (17), comme résumé et présenté par l'ESAC (15), l'exactitude de la distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et non-sensibilisants était de 91.7 % (N = 28), avec une sensibilité de 92.4 % (N = 19) et une spécificité de 90.1 % (N = 9). L'exactitude équilibrée s'élevait à 91.2 %. En omettant les produits chimiques d'essai se retrouvant également dans l'ensemble de données d'entraînement GARDskin, c'est-à-dire en prenant en considération uniquement les produits chimiques n'ayant pas encore été utilisés, l'exactitude de la distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et non-sensibilisants était de 95.4 % (N = 17), la sensibilité de 96.6 % (N = 13) et la spécificité de 91.7 % (N = 4). L'exactitude équilibrée s'élevait à 94.1 %.

7. À la suite de la soumission de la méthode GARDskin, l'OCDE a publié la Ligne directrice sur les approches définies pour la sensibilisation cutanée (18). Cette publication a rendu public un vaste ensemble de données relatives aux produits chimiques, avec des données de référence humaines et ELGL ayant fait l'objet d'une curation (19). En tenant compte de ces données de référence après curation, la performance prédictive de la méthode GARDskin a été calculée avec les données GARDskin obtenues lors de l'étude de validation (13) (14) ou disponibles dans d'autres études publiées (20). Les calculs ont été effectués 1a la fois en incluant et en excluant les produits chimiques communs avec ceux utilisés lors du développement de la méthode, comme résumé dans les Tables 1A et 1B, respectivement. Ces chiffres reposant sur des ensembles de données déséquilibrés, la mesure

² Produits chimiques n'ayant pas permis de générer un résultat valide en raison de critères d'acceptabilité non remplis, comme décrit à la section « Procédure ».

de la spécificité doit être considérée comme incertaine.

Tableau 1A. Performance de la méthode GARDskin par rapport aux données de référence humaines ou ELGL (19). Les calculs incluent les produits chimiques communs avec ceux utilisés lors du développement de la méthode.

	ELGL				Données humaines	
		NS	S		NS	S
		(N = 1)	(N = 6)		(N = 9)	(N = 2)
GARDskin	NS	9.89	8.16		4.94	3.68
	S	1.11	55.9		4.06	23.3
Exactitude		87.6 %			78.5 %	
Sensibilité		87.2 %			86.4 %	
Spécificité		89.9 %			54.9 %	
Exactitude équilibrée		88.6 %			70.7 %	
N		75			36	

1. Les matrices de confusion reposent sur des calculs pondérés des résultats GARDskin, comme mis en œuvre par l'ESAC (15).

Tableau 1B. Performance de la méthode GARDskin par rapport aux données de référence humaines ou ELGL (19). Les calculs excluent les produits chimiques communs avec ceux utilisés lors du développement de la méthode.

	ELGL				Données humaines	
		NS	S		NS	S
		(N = 5)	(N = 47)		(N = 6)	(N = 18)
GARDskin ¹	NS	4.33	4.92		2.50	2.89
	S	0.667	42.1		3.50	15.1
Exactitude		89.3 %			73.4 %	
Sensibilité		89.5 %			84.0 %	
Spécificité		86.7 %			41.7 %	
Exactitude équilibrée (%)		88.1 %			62.8 %	
N		52			24	

1. Les matrices de confusion reposent sur des calculs pondérés des résultats GARDskin, comme mis en œuvre par l'ESAC (15).

8. L'ensemble de ces informations montre que la méthode GARDskin peut utilement contribuer à l'identification du danger de sensibilisation cutanée. Cependant, il convient de l'associer à d'autres sources d'information dans le contexte d'une IATA et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction générale.

9. Les limites connues de la méthode sont principalement liées à des problèmes de solubilité et de compatibilité avec les véhicules et le milieu cellulaire aqueux. Les produits chimiques autofluorescents peuvent en outre interférer avec les évaluations de la cytotoxicité par cytométrie en flux. On trouvera à l'Appendice II une liste des limites connues ainsi que des solutions de contournement possibles. Il est démontré que la méthode GARDskin est applicable à des produits chimiques d'essai couvrant une grande variété de groupes fonctionnels organiques, de mécanismes de réaction, de puissances de sensibilisation cutanée et de propriétés physicochimiques (12)(14)(20) Les données actuellement disponibles ne font pas ressortir de classes et/ou de types spécifiques de produits chimiques qui seraient exclus du domaine d'applicabilité. Des conclusions analogues ont été tirées d'un examen indépendant des données communiquées, conduit par des systèmes experts/experts, un élément qui était

également inclus dans l'ensemble de données soumis à l'examen par les pairs de l'ESAC (21). Précision importante, l'applicabilité de la méthode et sa performance prédictive sont maintenues dans certains sous-ensembles de l'espace chimique habituellement considérés comme intrinsèquement difficiles à évaluer avec exactitude. Citons, par exemple, les composés lipophiles ($\text{LogP} > 3.5$) (20), les haptènes avec action indirecte (15) et les composés métalliques (22).

10. La méthode GARDskin a été validée pour l'évaluation des substances mono-constituants. Bien que non évaluée lors des études de validation, la méthode d'essai est néanmoins techniquement applicable pour tester les substances multi-constituants et les mélanges (20)(23). Les définitions sont fournies dans l'appendice 1.

Démonstration des compétences du laboratoire

11. Avant d'utiliser en routine la méthode GARDskin, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en appliquant la méthode d'essai. Pour cela, ils doivent soumettre à l'essai un ensemble défini de substances d'épreuve aux propriétés sensibilisantes connues, qui sont répertoriées à l'Appendice III. Ces essais permettront également de confirmer la réactivité du système d'essai. Toute mise à l'essai d'une substance d'épreuve de compétence doit s'effectuer dans le strict respect de la procédure décrite ici, et les résultats doivent être conformes aux classifications énumérées à l'Appendice III. De plus, l'installation d'essai devra conserver une base des données historiques générées avec les substances d'épreuve afin de confirmer la reproductibilité de la méthode d'essai au fil du temps.

Principe de la méthode d'essai

12. La méthode GARDskin utilise la lignée cellulaire SenzaCell, un sous-clone de la lignée cellulaire de leucémie myéloïde MUTZ-3, comme modèle de substitution *in vitro* des cellules dendritiques. À la suite de l'exposition au produit chimique d'essai pendant 24 h, à des concentrations d'exposition spécifiques du produit concerné, le résultat quantifiable de l'essai est le niveau d'expression génique de la SPG GARDskin, obtenu à partir des mesures de l'ARN total isolé des cultures cellulaires exposées et évalué par le système NanoString nCounter®.

13. Les données en haute dimension sont analysées au moyen de l'outil GDAA, qui héberge un algorithme de prédiction utilisant un séparateur à vaste marge (SVM) (24), entraîné de manière appropriée et figé pendant le développement de l'essai (12). En fonction des niveaux d'expression génique obtenus dans les cultures cellulaires exposées aux produits chimiques d'essai, les résultats de l'algorithme GARDskin prédisent si chaque produit est un sensibilisant cutané (catégorie 1 du SGH de l'ONU) ou un non-sensibilisant.

Logiciel dans le nuage

14. Le pipeline d'analyse des données GARDskin repose sur un logiciel dans le nuage, appelé GDAA, doté d'une fonction de gestion des versions, qui facilite l'ensemble du flux d'analyse des données, du prétraitement des données brutes à la classification finale des produits chimiques d'essai. L'outil GDAA est conçu pour garantir l'intégrité des données conformément aux directives publiées (25)(26).

15. Les installations d'essai doivent vérifier régulièrement et/ou avant utilisation (sur la base d'une évaluation des risques) toutes les fonctions de l'outil GDAA (25)(26). Elles doivent donc télécharger vers le système dans le nuage un ensemble de données d'essai de référence historiques puis les faire traiter/analyser par le logiciel. Elles sont chargées de déterminer les produits chimiques d'essai à inclure dans cet ensemble de données de référence, sachant que, pour chacun d'entre eux, les résultats obtenus – valeurs de décision obtenues et sommes de contrôle calculées par l'algorithme Message Digest 5 (MD5) – doivent être exacts et reproductibles au fil du temps (27). De plus amples détails et explications sur les valeurs de décision et les sommes de contrôle MD5 figurent à la section *Analyse des données et rapport* de la présente LD. Les résultats issus de la vérification périodique et avant utilisation du logiciel doivent être documentés aux fins du suivi de la stabilité du système (informatisé) au fil du temps.

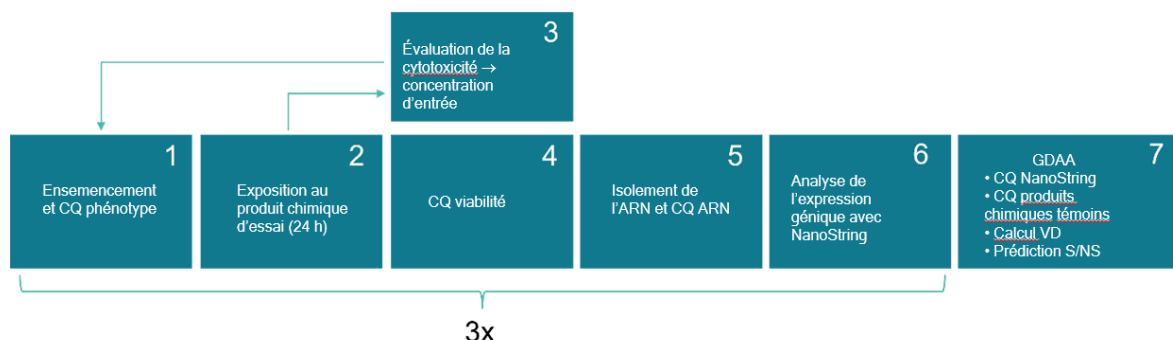
Procédure

16. Le protocole d'essai GARDskin (*GARDskin Assay Protocol*) est accessible au public sur le site du système de suivi des méthodes de substitution en voie d'acceptation réglementaire (*Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance – TSAR*) (28). Il convient d'appliquer ce protocole d'essai lors de la mise en œuvre de la méthode GARDskin au laboratoire. Les paragraphes suivants donnent une description des principaux éléments et procédures de la méthode d'essai GARDskin et le graphique 1 en présente schématiquement les étapes consécutives.

17. Dans la méthode GARDskin, les expositions chimiques sont réalisées au cours de deux séries d'expériences successives. La première série d'expériences consiste à évaluer la cytotoxicité pour identifier, à partir des propriétés cytotoxiques du produit chimique d'essai considéré, une concentration d'exposition adaptée, propre à ce produit, appelée concentration d'entrée GARD. La deuxième série d'expériences est celle des stimulations principales effectuées à la concentration d'entrée GARD définie précédemment afin de prélever l'ARN pour une analyse en aval.

18. Trois stimulations principales indépendantes constituant des réplicats biologiques doivent être effectuées. Dans le contexte de cette description de la procédure GARDskin, ces expériences indépendantes qui constituent des réplicats biologiques sont définies comme des expériences identiques réalisées avec i) des cultures cellulaires séparées (c'est-à-dire des lots de cellules distincts) et ii) des préparations des produits chimiques d'essai et des témoins également séparées et indépendantes.

19. La mesure du critère d'évaluation GARDskin, c'est-à-dire la quantification des transcriptions de l'ARNm de la SPG GARDskin, est réalisée au moyen du système d'analyse NanoString nCounter, en utilisant un CodeSet composé de sondes correspondant aux gènes de la SPG GARDskin. Les données brutes obtenues concernant les niveaux d'expression génique sont analysées avec l'outil GDAA, et chaque produit chimique d'essai est classé par le modèle de prédiction GARDskin comme sensibilisant ou non-sensibilisant.



Graphique 1. Représentation graphique des étapes consécutives de la procédure GARDskin. Une expérience d'évaluation de la cytotoxicité comprend la combinaison séquentielle des étapes 1 à 4, tandis qu'une expérience de stimulation principale suit les étapes 1, 2 et 4 à 6. Après avoir conduit trois expériences indépendantes de stimulation principale, on effectue toutes les analyses de données à l'aide de l'outil GDAA, comme indiqué à l'étape 7. CQ : contrôle de qualité. VD : valeur de décision.

Cellules

20. La méthode GARDskin nécessite l'utilisation de la lignée cellulaire humaine SenzaCell, dérivée de la leucémie myéloïde. Cette lignée cellulaire SenzaCell est fournie par SenzaGen AB³, après conclusion d'un accord approprié de licence de la technologie GARD. Elle est livrée dans de la neige carbonique et doit être conservée à < -136 °C, conformément au document-guide intitulé *Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)* (29). Elle doit être amplifiée et congelée dans l'azote liquide à une concentration de 7×10^6 cellules/mL dans un milieu cellulaire supplémenté avec 10 % v/v de diméthylsulfoxyde (DMSO) (qualité biologique moléculaire, ≥ 99 %).

21. Le travail cellulaire doit avoir lieu dans des conditions stériles, sans antibiotiques. Les centrifugations de la lignée cellulaire SenzaCell doivent être effectuées à 300-315 x g, pendant 5 min, à une température comprise entre 2 et 8 °C. L'incubation doit être effectuée à 37 °C en atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. La lignée cellulaire SenzaCell doit être cultivée dans des flacons de culture pour la conservation et l'amplification ou des plaques de culture pour l'exposition aux produits chimiques. Elle doit être cultivée dans un milieu MEM alpha (avec L-glutamine, avec ribo- et désoxyribonucléosides) supplémenté avec 20 % (v/v) de sérum bovin fœtal (SBF) et 40 ng/mL de GM-CSF (qualité supérieure, pureté > 97 %, niveau d'endotoxines < 0.1 EU/μg de cytokine et activité $\geq 5 \times 10^6$ UI/mg). Les cultures cellulaires doivent être comptées et divisées à une concentration de 0.2×10^6 cellules/mL tous les 3 à 4 jours sans dépasser 16 repiquages après décongélation. Les cellules doivent être ensemencées pour l'exposition aux produits chimiques d'essai directement après leur séparation, c'est-à-dire que les expériences d'exposition aux produits chimiques doivent être programmées pour coïncider avec l'entretien de routine de la culture cellulaire. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 12 puits ou 24 puits à fond plat, avec un volume total final

³ SenzaGen AB

Medicon Village

SE-223 81 Lund, Suède

info@senzagen.com

par puits de 4 mL et 2 mL, respectivement. Il est possible d'utiliser d'autres types et tailles de plaques à condition que des résultats équivalents et reproductibles soient démontrés. Les expériences d'évaluation de la cytotoxicité doivent être réalisées entre le 4^e et le 16^e repiquage et les expériences de stimulation principale entre le 6^e et le 12^e repiquage.

Procédures de contrôle de la qualité phénotypique et critères d'acceptabilité

22. Le phénotype des cellules non traitées doit être évalué le jour-même des expériences prévoyant l'exposition à un produit chimique. Cela vise à garantir que les cellules sont maintenues dans un état inactivé et à détecter toute dérive phénotypique éventuelle.

23. Toutes les étapes de lavage nécessaires à l'analyse par cytométrie en flux doivent se faire dans un tampon de lavage, c'est-à-dire tampon phosphate salin (PBS) contenant 0.5-1 % (m/m) d'albumine de sérum bovin (fraction V de Cohn) ; une stérilisation par filtration à 0.2 µm est nécessaire. Les cellules doivent être colorées avec des anticorps monoclonaux marqués contre les antigènes humains CD1a, CD14, CD34, CD54, CD80, CD86 et HLA-DR, ainsi qu'avec des témoins isotypes polyclonaux pertinents. Parmi les anticorps recommandés figurent les anticorps suivants marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) : anti-CD86 (BD Biosciences, n° 555657), anti-HLA-DR (BD Biosciences, n° 347400), anti-CD34 (BD Biosciences, n° 555821), anti-CD1a (Agilent Dako, n° F714101-2) et anticorps polyclonaux murins anti-IgG1 conjugués au FITC (BD Biosciences, n° 555748). En outre, les anticorps suivants marqués à la phycoérythrine (PE) sont également recommandés : anti-CD54 (BD Biosciences, n° 555511), anti-CD14 (Agilent Dako, n° R086401-2), anti-CD80 (BD Biosciences, n° 340294) et anticorps polyclonaux murins anti-IgG1 conjugués au PE (BD Biosciences, n° 555749). De plus, l'iodure de propidium (IP), à une concentration de 50 µg/mL (BD Biosciences, n° 556463), est utilisé pour l'analyse de la viabilité cellulaire. Il est néanmoins possible de recourir à des anticorps et à des marqueurs de viabilité équivalents à condition que leurs similitudes fonctionnelles soient démontrées et documentées. On notera que chaque nouveau lot d'anticorps nécessite un titrage utilisant la lignée cellulaire SenzaCell afin de déterminer la concentration de saturation. Il est préférable de procéder à la coloration des anticorps par paires, avec un anticorps marqué par FITC et un par PE par échantillon. Dans chaque échantillon, ~ 0.2 × 10⁶ cellules sont lavées deux fois avant la coloration. Après incubation, les cellules colorées sont lavées à nouveau et remises en suspension dans le tampon de lavage.

24. Les échantillons sont analysés avec un cytomètre en flux (ayant la capacité de détecter les fluorochromes PE et FITC, en fonction des anticorps choisis) et un minimum de 10 000 événements doit être enregistré. Une analyse hiérarchique de l'échantillon ou « gating » peut être effectuée avec le logiciel du cytomètre en flux ou un autre logiciel d'analyse apparenté, selon les instructions du fournisseur. De plus amples détails sur les procédures d'analyse hiérarchique et la quantification de l'expression des biomarqueurs phénotypiques à la surface cellulaire figurent dans le protocole d'essai GARDskin (28).

25. Les résultats obtenus doivent remplir les critères d'acceptabilité listés dans le tableau 2. Si un biomarqueur se situe en dehors des fourchettes déterminées, le lot de cellules ne doit pas être utilisé pour les expériences d'exposition aux produits chimiques et des évaluations distinctes pourront être requises pour vérifier les propriétés des anticorps utilisés.

Tableau 2. Critères d'acceptabilité du contrôle de la qualité de la viabilité et de la qualité phénotypique

Paramètre	Critères d'acceptabilité (%) ¹
<i>Biomarqueur phénotypique</i>	
CD86	10-40
CD54	+ (> 90)
HLA-DR	+ (> 60)
CD80	< 10
CD34	+ (35-70)
CD14	+ (5-50)
CD1a	+ (10-60)
<i>Coloration de viabilité</i>	
Cellules IP négatives (viabilité absolue)	≥ 84.5

1. Le symbole « + » indique la présence de cellules positives (> 0 %). Il n'est pas nécessaire que toute la population cellulaire soit positive. Les chiffres donnés entre parenthèses sont les fourchettes attendues en fonction des données historiques du laboratoire de mise en œuvre, mais ne font pas partie des critères d'acceptabilité. Comme il est connu que la lignée cellulaire SenzaCell est hétérogène, des variations sont attendues.

Critères d'acceptabilité des témoins GARD

26. Chaque évaluation GARDskin doit donner lieu à l'analyse d'un ensemble de témoins. Le témoin non stimulé (milieu de culture cellulaire) et le témoin négatif (solvant du produit chimique d'essai) doivent être analysés à chaque expérience d'évaluation de la cytotoxicité. Le témoin non stimulé, le témoin négatif et le témoin positif (*p*-phénylènediamine, PPD, n° CAS 106-50-3) doivent être analysés à chacune des trois expériences de stimulation principale.

27. Le témoin non stimulé est utilisé pour la détermination de la viabilité cellulaire absolue des lots de cellules, pour les calculs de la viabilité cellulaire relative dans les expériences d'évaluation de la cytotoxicité et de stimulation principale ainsi qu'à des fins de normalisation dans le cadre de l'analyse des données, comme décrit plus en détail dans le *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method (7)* et à la section *Analyse des données* ci-dessous.

28. Le témoin négatif doit présenter une viabilité relative ≥ 95.5 % dans la ou les expériences d'évaluation de la cytotoxicité ainsi que dans les expériences de stimulation principale et être classé comme non-sensibilisant par le modèle de prédiction GARDskin, comme défini au paragraphe 76, pour vérifier que les cellules n'ont été activées à aucune des étapes des procédures expérimentales de la méthode.

29. Le témoin positif (PPD) doit présenter une viabilité relative allant de 84.5 à 95.4 % dans les expériences de stimulation principale et être classé comme sensibilisant par le modèle de prédiction GARDskin, comme défini au paragraphe 76, pour démontrer que les cellules utilisées pendant une expérience sont réactives et peuvent être activées lors de l'exposition à un sensibilisant.

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

30. Le produit chimique d'essai et les substances témoins doivent être stockés

conformément aux instructions du donneur d'ordre ou du fournisseur afin de garantir leur stabilité. Leur préparation doit avoir lieu le jour des expériences d'exposition des cellules.

31. Les produits chimiques doivent être dissous dans un solvant compatible afin de former des solutions mères appropriées à la concentration cible nécessaire dans les puits. Les solvants compatibles utilisés pendant la validation de la méthode sont listés dans le tableau 3, conjointement avec les concentrations cibles maximales dans les puits, pour lesquelles un effet non détectable sur les niveaux d'expression génique à l'échelle du génome est confirmé. Les concentrations correspondantes doivent être utilisées pour le témoin négatif. Le témoin positif est de préférence dissous dans du DMSO à 1 000 fois la concentration cible dans les puits. Il est possible d'utiliser d'autres solvants que ceux listés dans le tableau 3 ou une solution directe dans les milieux cellulaires à condition que la compatibilité de la méthode soit démontrée et que les raisons scientifiques de ce choix soient expliquées. Le solvant ne doit pas entraîner de cytotoxicité cellulaire et doit être classé comme non-sensibilisant à la concentration proposée dans les puits.

Tableau 3. Liste des solvants compatibles GARDskin utilisés pendant la validation de la méthode

Solvant	N° CAS	Concentration maximale dans les puits (%)
DMSO ≥ 99 %	67-68-5	0.1
Eau ¹	-	0.1

1. Qualité culture cellulaire.

32. La concentration cible maximale dans les puits de tout produit chimique d'essai est de 500 µM. Pour les produits chimiques dont la masse moléculaire n'est pas déterminée, une concentration maximale dans les puits de 100 µg/mL est définie par défaut, comme établi à partir d'études empiriques (23), à moins de pouvoir justifier la préférence pour d'autres concentrations.

33. La solubilité du produit chimique d'essai, aussi bien dans le solvant sélectionné que dans toutes les dilutions en aval dans les milieux cellulaires, doit être vérifiée par un contrôle visuel de la solution. Si nécessaire, l'agitation au vortex et le chauffage (à 37 °C) sont autorisés pour parvenir à la dissolution complète, à condition que cela ne compromette en aucun cas la stabilité du produit chimique d'essai. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble à la concentration maximale de 500 µM, il convient d'utiliser le solvant permettant d'obtenir la concentration la plus élevée du produit chimique d'essai dans les puits.

34. Les solutions mères doivent être préparées à une concentration appropriée dans le solvant sélectionné, en tenant compte des effets de dilution et des concentrations cibles des produits chimiques d'essai et des solvants qu'on cherche à obtenir dans les puits. En règle générale, avec les solvants figurant dans le tableau 3, la concentration de telles solutions peut être préparée à 1 000 fois les concentrations cibles dans les puits. Dans les exemples ci-dessous, la solution mère est appelée solution A. Il est préférable de diluer à nouveau la solution A d'un produit chimique d'essai dans un milieu (solution B dans les exemples ci-dessous) avant d'ajouter le produit chimique d'essai à la culture cellulaire.

35. Si la solution A est peu soluble dans la solution B (ce qui prend généralement la forme d'un précipité dans le milieu), la concentration soluble la plus élevée dans la solution B est utilisée.

36. On notera que, si cela est scientifiquement justifié et motivé par des avantages pratiques (p. ex. observation d'une augmentation de la solubilité de certains produits

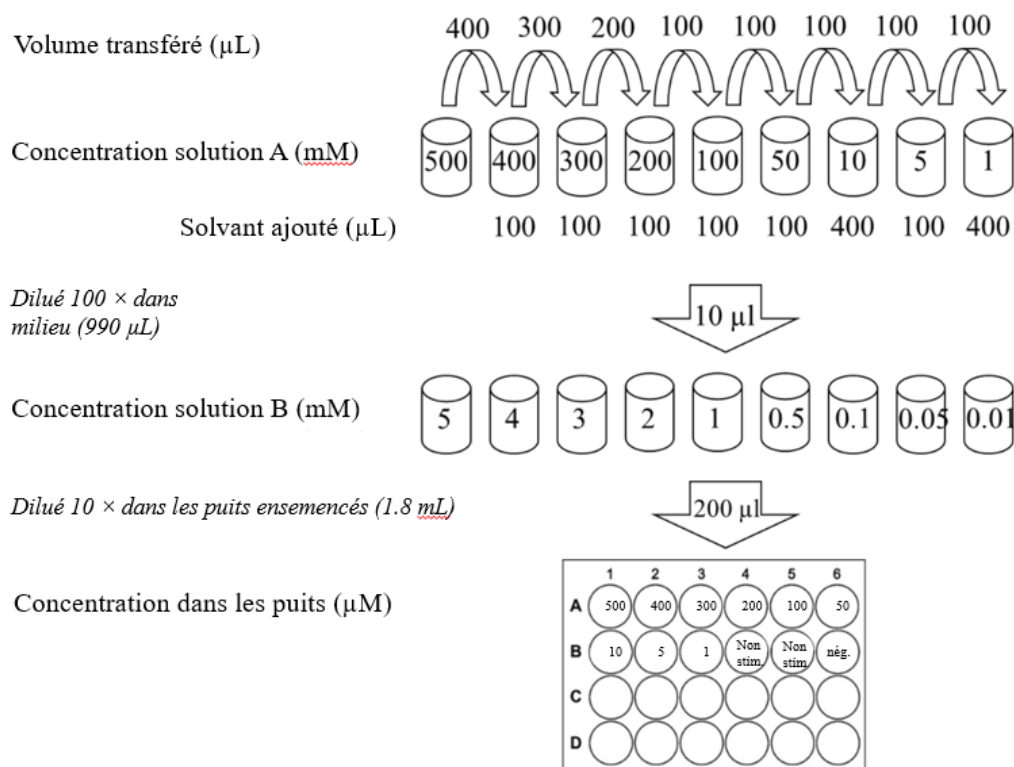
chimiques), le schéma de dilution décrit ci-dessus pour les solutions A et B peut être omis, à condition de respecter les indications du présent document concernant la concentration des cellules dans les puits et les concentrations maximales des produits chimiques d'essai et des solvants dans les puits. Dans de tels cas, une dilution directe à partir de la solution A dans le puits peut constituer une solution acceptable. De même, s'il est justifié d'utiliser un autre solvant associé à une concentration maximale limite dans les puits différente, et si sa compatibilité est prouvée, les concentrations des solutions A et B peuvent différer.

Expérience d'évaluation de la cytotoxicité

37. Le but d'une expérience d'évaluation de la cytotoxicité est de définir une concentration d'exposition propre au produit chimique d'essai, appelée concentration d'entrée GARD, à utiliser dans les stimulations principales en aval. La concentration d'entrée GARD est fonction de la solubilité et des propriétés cytotoxiques du produit chimique d'essai, ces deux éléments étant étudiés dans la procédure décrite ici.

38. Le graphique 2 présente un exemple schématique d'une expérience usuelle d'évaluation de la cytotoxicité. Une série de dilutions du produit chimique d'essai est réalisée dans le solvant sélectionné, à partir de la concentration maximale par défaut dans les puits de 500 μM (ou de la concentration soluble la plus élevée inférieure à 500 μM), pour obtenir une série de concentrations de la solution A. Il est recommandé de mélanger et d'agiter au vortex entre chaque étape de dilution. À partir de la solution A, il convient de préparer une série de concentrations de la solution B en ajoutant un volume approprié de solution A au milieu. Si nécessaire, il est possible d'agiter au vortex et de chauffer (à 37 °C) pour optimiser la dissolution. De plus, le solvant utilisé doit être dilué dans le milieu à la concentration de la solution B (témoin négatif) afin d'obtenir la concentration correspondante de solvant dans les puits.

39. Les cellules sontensemencées en vue de l'exposition au produit chimique directement après leur séparation, à une concentration appropriée tenant compte de la dilution qui se produit lors de l'ajout de solution(s) mère(s) du produit chimique d'essai et/ou des témoins. La concentration cellulaire finale dans les puits, après ajout du produit chimique d'essai, doit être de 0.2×10^6 cellules/mL.



Graphique 2. Exemple schématique de préparation du produit chimique et d'ensemencement pour une expérience typique d'évaluation de la cytotoxicité dans une plaque 24 puits, illustrant les dilutions en série de la solution A, la conversion des solutions A en solutions B par dilution dans le milieu et la configuration typique d'une plaque après ensemencement des cellules et ajout du produit chimique d'essai. Il convient de noter l'inclusion de témoins non stimulés et négatifs dans chaque expérience.

40. La ou les plaques où les cultures cellulaires sont exposées au(x) produit(s) chimique(s) d'essai et aux témoins sont couvertes avec un couvercle en plastique et incubées pendant 24 h à 37 °C en atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

41. Après 24 h d'incubation, la viabilité relative des cultures cellulaires exposées (par rapport à la viabilité absolue des cultures cellulaires non exposées) doit être étudiée. Dans le cas d'un essai utilisant l'IP basé sur la cytométrie en flux, la procédure suivante est recommandée.

42. La suspension de chaque puits est divisée pour obtenir des échantillons dupliqués destinés à la cytométrie en flux. Les étapes de coloration et de lavage pour l'analyse par cytométrie en flux sont réalisées dans un tampon de lavage, comme décrit au paragraphe 23. Les cellules sont lavées deux fois et chaque échantillon est coloré avec le tampon de lavage et l'IP, 50:1, comme décrit au paragraphe 23. Les échantillons sont incubés dans l'obscurité à une température située entre 2 et 8 °C pendant ~ 15 min. Les cellules sont rincées une fois dans ~ 1 mL et remises en suspension dans un volume approprié de tampon de lavage.

43. Il est nécessaire de disposer de groupes dupliqués de cultures cellulaires non stimulées afin d'obtenir, pour la cytométrie en flux, des échantillons techniques dupliqués i) de témoins

non stimulés non colorés et ii) de témoins non stimulés colorés. Les témoins non stimulés non colorés sont utilisés pour définir les fenêtres ou « gates » pendant l'analyse, tandis que les témoins non stimulés colorés servent aux calculs de la viabilité relative, comme décrit ci-dessous. L'inclusion de cultures cellulaires non stimulées dupliquées est illustrée au graphique 2.

44. Les échantillons préparés sont analysés avec un cytomètre en flux, comme décrit au paragraphe 24.

45. L'analyse des échantillons colorés à l'IP doit être faite sans exclusion des cellules mortes et des débris.

46. On utilise l'échantillon non stimulé non coloré pour définir une fenêtre applicable aux cellules positives et négatives à l'IP, en définissant les contours de la population cellulaire dans un graphique de dispersion PE/FITC. On applique ensuite ces fenêtres positives et négatives à l'IP à l'analyse de tous les échantillons colorés à l'IP dans un graphique de dispersion PE/FITC. Le pourcentage de cellules négatives à l'IP est enregistré pour chaque échantillon, ce qui représente une estimation de la viabilité absolue. La viabilité relative de chaque échantillon est calculée conformément à l'équation 1. Pour chaque concentration du produit chimique d'essai de la série de dilutions et pour chaque témoin, on calcule la moyenne des valeurs obtenues pour les échantillons dupliqués.

$$Rv = \frac{V_s}{V_c} \cdot 100 \quad (1)$$

où

Rv est la viabilité relative de l'échantillon en % ;

V_s est la viabilité absolue de l'échantillon en % ;

V_c est la viabilité absolue moyenne des deux échantillons témoins non stimulés colorés à l'IP en %.

47. Les témoins doivent satisfaire aux critères suivants : témoin non stimulé : viabilité absolue moyenne ≥ 84.5 % et témoin négatif : viabilité relative moyenne ≥ 95.5 %. (On notera que ces critères font également partie des critères d'acceptabilité du contrôle de la viabilité après les expériences de stimulation principale, comme décrit plus en détail à la section *Stimulations principales* et dans le tableau 4.)

48. La concentration d'entrée GARD utilisée pour les stimulations principales d'un produit chimique d'essai sera déterminée comme suit.

i) Un produit chimique d'essai induisant une cytotoxicité doit être utilisé à la concentration qui permet d'obtenir une viabilité relative moyenne située entre 84.5 % et 95.4 %. Cette concentration garantit la biodisponibilité du produit chimique d'essai sans altérer les réponses immunologiques. Si plusieurs concentrations remplissent le critère d'acceptabilité, on choisit comme concentration d'entrée GARD celle qui génère la viabilité relative la plus proche de 90 %. Si la viabilité relative diminue de ≥ 95.5 % à < 84.5 % entre deux points de données de la série de dilutions, il est nécessaire de répéter la ou les expériences d'évaluation de la cytotoxicité en ajoutant des concentrations supplémentaires dans la plage de concentration critique. L'interpolation entre les points de données n'est pas recommandée, car on ne peut pas supposer qu'il y a linéarité.

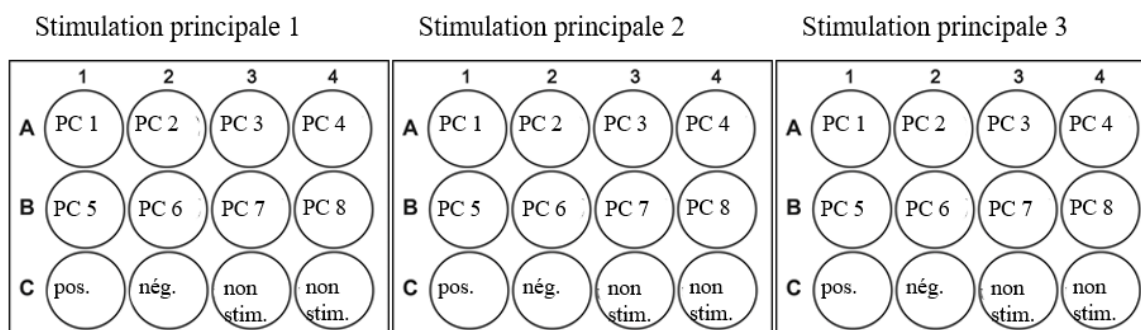
ii) Un produit chimique d'essai non cytotoxique (viabilité relative ≥ 95.5 %) doit être utilisé à une concentration de 500 µM ou à la concentration soluble la plus élevée.

iii) Un produit chimique d'essai présentant des problèmes de solubilité dans la solution A ou B

et qui n'est pas cytotoxique doit être réévalué pour vérifier s'il est possible de recourir à une autre méthode de solubilité, par exemple application de chaleur ou changement de véhicule, afin d'augmenter la concentration dans les puits et de se rapprocher ainsi de la concentration maximale dans les puits de 500 µM.

Stimulations principales

49. Une fois que la concentration d'entrée est établie pour un produit chimique, les stimulations principales sont répétées dans le cadre de trois expériences indépendantes valides conduites avec des préparations indépendantes (produit chimique d'essai et témoins, c'est-à-dire témoin non stimulé, témoin négatif et témoin positif) et des cultures cellulaires indépendantes provenant de lots de cellules distincts afin d'obtenir trois réplicats biologiques valides. Ces trois stimulations principales peuvent être réalisées en parallèle ou successivement, mais toujours avec des solutions mères indépendantes, aussi bien pour le produit chimique d'essai que pour les témoins. S'il est prévu d'analyser plusieurs produits chimiques dans le cadre de la même expérience, le même ensemble de témoins doit être utilisé, quel que soit le nombre de plaques, à condition que tous les produits chimiques d'essai soient dissous dans le même véhicule. Si des véhicules différents sont utilisés pour des produits chimiques d'essai différents dans la même expérience, des témoins négatifs supplémentaires sont nécessaires, correspondant à chaque véhicule utilisé dans l'expérience. Le graphique 3 montre un exemple schématique de trois expériences de stimulation principale avec huit produits chimiques d'essai et trois témoins, y compris un puits supplémentaire avec témoins non stimulés. Dans cet exemple, on suppose que tous les produits chimiques d'essai sont dissous dans le même véhicule, c'est pourquoi un seul témoin négatif est inclus.



Graphique 3. Exemple schématique avec huit produits chimiques d'essai et les témoins stimulés dans le cadre des trois stimulations principales constituant des réplicats biologiques, dans des plaques 12 puits. PC : produit chimique d'essai.

50. Les procédures d'ensemencement à appliquer pour les stimulations principales sont globalement identiques à celles décrites aux paragraphes 38-39 pour les expériences d'évaluation de la cytotoxicité, à l'exception du fait qu'une seule concentration est étudiée pour chaque produit chimique d'essai. On trouvera ci-après le résumé succinct d'un mode opératoire usuel.

51. Un volume approprié de solution A du produit chimique d'essai est préparé dans un solvant adapté, comme établi pour la préparation du produit chimique d'essai. Des mesures adéquates doivent être appliquées si nécessaire, p. ex. agitation au vortex et chauffage (à 37 °C), pour parvenir à la dissolution complète.

52. La concentration de solution B est préparée en ajoutant un volume approprié de solution A au milieu cellulaire (en fonction de la concentration cible maximale de solvant dans les puits). Des mesures adaptées peuvent être appliquées si nécessaire, p. ex. agitation au vortex et chauffage (à 37 °C), pour parvenir à la dissolution complète.

53. De plus, les témoins positifs et négatifs doivent être préparés de façon à atteindre des concentrations appropriées dans les puits.

54. Les cellules sontensemencées pour l'exposition aux produits chimiques directement après leur séparation, à une concentration appropriée tenant compte de la dilution qui se produit lors de l'ajout de solution(s) mère(s) du produit chimique d'essai et/ou des témoins. La concentration cellulaire finale dans les puits, après ajout du produit chimique d'essai, doit être de 0.2×10^6 cellules/mL.

55. On notera que, si cela est justifié et motivé, l'option consistant à omettre l'étape de dilution de la solution B, comme décrit à la section *Expérience d'évaluation de la cytotoxicité* ci-dessus, vaut également pour les expériences de stimulation principale. D'autres schémas de dilution des produits chimiques d'essai, ne reposant pas sur les solutions A et B décrites dans le présent document, sont acceptables à condition que la concentration cible de produit chimique dans les puits, la concentration cellulaire et la concentration maximale de solvant soient respectées.

56. La ou les plaques sont couvertes avec un couvercle en plastique et incubées pendant 24 h à 37 °C en atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

57. Après 24 h d'incubation, la culture cellulaire est mélangée délicatement à la pipette, par aspiration et refoulement, puis la culture de chaque puits est divisée dans des microtubes sans RNase et en échantillons dupliqués pour la cytométrie en flux.

58. Les échantillons dans les microtubes sont utilisés pour l'isolement de l'ARN. À cet effet, les culots cellulaires sont lysés avec un réactif approprié et adapté à cet usage, p. ex. réactif TRIzol (Ambion, n° 15596018), conformément aux instructions du fournisseur. Les échantillons de lysat cellulaire peuvent être conservés à ≤ -70 °C jusqu'à un an.

59. Pour chaque produit chimique d'essai et chaque témoin, plusieurs échantillons de lysat cellulaire peuvent être obtenus à partir de chacune des trois stimulations principales. Cependant, un seul échantillon de lysat cellulaire issu de chacune des stimulations principales est nécessaire pour l'isolement de l'ARN et sera ensuite analysé avec le système NanoString nCounter. Tous les réplicats restants de lysat cellulaire peuvent être conservés (à ≤ -70 °C) comme échantillons de secours, puisqu'il se pourrait que la concentration ou la qualité de l'ARN soit insuffisante dans le premier échantillon de lysat cellulaire.

60. Pour les échantillons destinés à la cytométrie en flux, il convient de suivre les mêmes procédures de lavage, de coloration et d'analyse que celles décrites aux paragraphes 42-46 pour l'expérience d'évaluation de la cytotoxicité.

Critères d'acceptabilité du contrôle de la qualité de la viabilité

61. Les échantillons colorés à l'IP sont utilisés pour contrôler la qualité de la viabilité afin de s'assurer que le produit chimique d'essai et les témoins présentent une viabilité relative ou absolue respectant les critères de contrôle de la qualité décrits dans le tableau 4. Si un produit chimique d'essai ne remplit pas les critères d'acceptabilité décrits, il ne doit pas être utilisé pour l'analyse en aval. Si un échantillon témoin ne remplit pas les critères d'acceptabilité décrits,

tous les échantillons provenant de la même expérience de stimulation principale doivent être exclus de l'analyse en aval.

Tableau 4. Critères d'acceptabilité du contrôle de la viabilité

Produit chimique d'essai ou témoin	Critères d'acceptabilité ¹
Témoin non stimulé	Viabilité absolue \geq 84.5 %
Témoin négatif	Viabilité relative \geq 95.5 %
Témoin positif	Viabilité relative 84.5-95.4 %
Produit chimique d'essai avec cytotoxicité attendue	Viabilité relative 84.5-95.4 %
Produit chimique d'essai dosé à 500 μ M ou à la concentration soluble la plus élevée	Viabilité relative \geq 84.5 %

1. Les critères d'acceptabilité énumérés pour le témoin non stimulé et le témoin négatif s'appliquent à la fois aux expériences d'évaluation de la cytotoxicité et aux expériences de stimulation principale, tandis que les critères fournis pour le témoin positif et le produit chimique d'essai ne valent que pour les expériences de stimulation principale.

Isolement de l'ARN

62. L'ARN total, englobant l'ARNm, est isolé à partir des échantillons cellulaires lysés au moyen d'un kit et de réactifs disponibles sur le marché, p. ex. Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, n° R2052) a été utilisé pendant le développement et la validation de la méthode d'essai.

63. Un matériel conçu pour l'analyse de l'ARN, p. ex. un bioanalyseur Agilent 2100, ou un instrument équivalent (c'est-à-dire mesurant la qualité de l'ARN et la concentration d'ARN dans la gamme de détection \sim 5-500 ng/ μ L) est utilisé pour quantifier la concentration d'ARN et analyser la qualité de l'ARN contenu dans chaque échantillon. Il convient de suivre les protocoles du fournisseur du matériel. La concentration et la qualité de l'ARN doivent correspondre aux recommandations NanoString. Pendant le développement et la validation de la méthode d'essai, un échantillon avec un numéro d'intégrité de l'ARN (RIN) de 8.0 ou supérieur, obtenu avec le bioanalyseur Agilent 2100, a été considéré comme un échantillon de haute qualité. Il est possible de recourir à des mesures de la qualité de l'ARN correspondantes ou autrement équivalentes pour s'assurer de la haute qualité de l'ARN.

Mesure de l'effet : analyse de l'expression génique avec le système NanoString nCounter®

64. L'essai GARDskin prévoit, comme mesure de l'effet, la quantification de l'ARNm de la signature de prédiction génomique (SPG) propre à cet effet au moyen du système NanoString nCounter. Le protocole NanoString nCounter commence par un traitement manuel incluant une étape d'hybridation au moyen d'un thermocycleur, c'est-à-dire l'essai d'expression génique nCounter XT CodeSet. Un CodeSet personnalisé, c'est-à-dire des ensembles de sondes oligonucléotidiques représentant les gènes de la SPG GARDskin, dont les gènes spécifiques sont présentés dans le *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method (7)*, est fourni par NanoString dans le cadre d'un accord de licence avec SenzaGen AB. Il convient de suivre les instructions du fabricant pour l'essai d'expression génique

nCounter XT CodeSet.

65. L'essai d'expression génique nCounter XT CodeSet est suivi d'un traitement automatisé des échantillons, avec immobilisation de la sonde/cible sur la cartouche nCounter, et de l'acquisition de données numériques par dénombrement des codes couleurs sur les sondes/cibles immobilisées sur la cartouche, au moyen de l'instrument nCounter®. Il convient de suivre les instructions correspondantes fournies avec l'instrument nCounter. Le mode de résolution et de sensibilité le plus élevé possible doit être choisi.

66. Pour chaque échantillon d'ARN analysé dans le système NanoString nCounter, un fichier de données brutes NanoString est créé, appelé fichier *Reporter Code Count* (RCC), contenant un dénombrement des molécules sous forme de tableau pour chaque molécule cible.

Analyse des données et rapport

Application d'analyse des données GARD

67. Une fois les fichiers RCC générés, l'intégralité des opérations de prétraitement, de normalisation et d'analyse des données en aval s'effectue dans le logiciel GDAA, comme résumé ci-dessous. Pour un examen approfondi de toutes ces étapes, il convient de se référer au *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (7). Lors de l'examen de la méthode, l'ESAC a évalué dans le détail aussi bien le pipeline d'analyse GARDskin que l'outil GDAA et a conclu que le logiciel était adapté et convivial.

68. L'outil GDAA est une application fondée sur l'infonuagique (Shinyapps sur Amazon Web Services) nécessitant un ordinateur connecté à l'internet avec un navigateur installé, p. ex. Google Chrome, Mozilla Firefox, Microsoft Edge. L'accès à l'outil GDAA requiert un accord de niveau de service et des identifiants de connexion valides, qui s'obtiennent tous deux auprès de SenzaGen AB (www.senzagen.com)⁴.

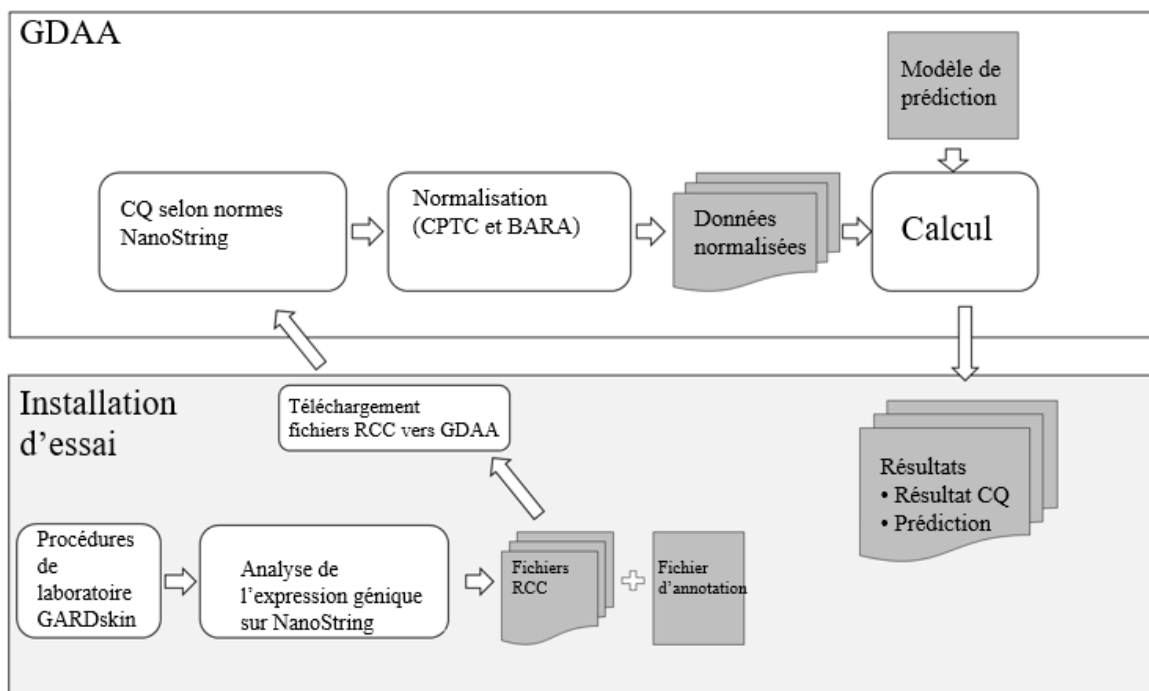
69. L'outil GDAA effectue toutes les analyses de données nécessaires pour générer des prédictions selon la méthode GARDskin. Il inclut les fonctionnalités suivantes : lecture des fichiers RCC, vérification du contrôle de qualité NanoString nCounter de chaque fichier téléchargé en amont, normalisation des valeurs d'expression génique du fichier lu par application progressive d'un algorithme de dénombrement (*Counts-Per-Total-Counts* – CPTC) (12) suivi d'une méthode de correction des effets de lot (*Batch Adjustment by Reference Alignment* – BARA) (30). Enfin, les échantillons individuels sont évalués à l'aide de l'algorithme de prédiction GARDskin, permettant la classification finale du produit chimique d'essai par le modèle de prédiction GARDskin. Le graphique 4 propose une représentation schématique des processus exécutés par l'outil GDAA et de leurs liens avec les autres étapes de la procédure.

⁴ SenzaGen AB

Medicon Village

SE-223 81 Lund, Suède

info@senzagen.com



Graphique 4. Schéma du flux de travail GDA, y compris fichiers d'entrée et de sortie. RCC : *Reporter Code Count* (données brutes d'expression génique) ; CPTC : *Counts-per-total-counts* (normalisation du contenu en ARN) ; BARA : *Batch Adjustment by Reference Alignment* (normalisation par ajustement des lots).

70. L'analyse avec l'outil GDA nécessite de télécharger vers cet outil deux types de fichiers : les fichiers RCC (contenant les données brutes des niveaux d'expression génique) et un fichier d'annotation (contenant des informations sur les échantillons devant permettre d'associer chacun des témoins et des produits chimiques d'essai aux fichiers RCC correspondants). On notera que les fichiers RCC relatifs à chaque produit chimique d'essai doivent être analysés conjointement avec les fichiers RCC des témoins non stimulés, positifs et négatifs des mêmes expériences de stimulation principale, pour permettre à la fois le processus de normalisation BARA, décrit plus en détail dans le *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (Y), ainsi que la classification des témoins négatifs et positifs, afin d'évaluer si les critères d'acceptabilité sont remplis (comme défini à la section *Résumé des critères d'acceptabilité*).

71. Une fois les fichiers téléchargés, la qualité de chaque fichier RCC est automatiquement vérifiée dans l'outil GDA. Les critères de qualité énumérés dans le tableau 5 sont une adaptation des critères d'acceptabilité (par défaut) recommandés par le fournisseur de l'outil. On trouvera dans le *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (Y) de plus amples informations concernant chaque indicateur de qualité répertorié dans le tableau 5. Les échantillons qui ne satisfont pas à l'un au moins des critères de contrôle de la qualité décrits ci-dessous ne sont pas utilisés pour l'analyse GARD ultérieure et l'outil GDA rejette automatiquement les échantillons qui ne remplissent pas les critères d'acceptabilité du contrôle de qualité NanoString nCounter®.

Tableau 5. Résumé des critères d'acceptabilité du contrôle de qualité NanoString nCounter®¹

Indicateur de qualité		Critères d'acceptabilité
Qualité d'imagerie	La qualité d'imagerie est représentée par la fraction des sections de la cartouche NanoString traitées avec succès.	> 0.75
Linéarité	La linéarité est exprimée sous la forme d'une valeur R2 estimée en utilisant les témoins positifs avec ajouts dosés.	> 0.95
Limite de détection	La limite de détection est évaluée en comparant les décomptes obtenus pour la sonde POS_E (témoin positif avec ajouts dosés) et pour les sondes témoins négatifs. La sonde POS_E est la sonde témoin positif avec ajouts dosés ayant la concentration la plus faible que l'on s'attend à observer au-dessus des niveaux de bruit.	< POS_E
Densité de liaison	La densité de liaison indique le niveau de saturation de l'image observé au cours du traitement de la cartouche. La valeur dépend de la quantité d'échantillon chargée et de l'efficacité de l'hybridation NanoString.	0.05-2.25

¹De plus amples informations figurent dans le *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (Y).

72. Les dernières étapes d'une analyse GARDskin comprennent l'application d'un algorithme de prédiction, lequel fournit en retour des données d'entrée au modèle de prédiction GARDskin, comme décrit à la section *Modèle prédictif* ci-dessous.

73. En plus de faciliter le pipeline d'analyse GARDskin complet, les fonctionnalités de l'outil GDAA permettent de vérifier l'intégrité des données transférées au moyen d'algorithmes de calcul des sommes de contrôle MD5. L'algorithme MD5 prend des données d'entrée de longueur arbitraire et calcule une empreinte numérique de 128 bits. Il produit toujours la même empreinte pour une entrée spécifique, et il est très improbable que deux entrées de données différentes génèrent les mêmes valeurs de sortie. Ses propriétés le rendent utile pour vérifier l'intégrité des données. Par exemple, il est possible de s'assurer de l'intégrité d'un fichier transféré en comparant les empreintes de 128 bits calculées avant le transfert avec les empreintes calculées après le transfert. Ces sommes de contrôle MD5 sont évaluées dans le cadre des vérifications périodiques et avant utilisation du système informatisé, comme décrit à la section *Vérification périodique du logiciel dans le nuage*.

Modèle prédictif

74. L'algorithme de prédiction GARDskin est un SVM hébergé dans l'outil GDAA, entraîné de manière appropriée et figé pendant le développement de la méthode. Le résultat qu'il produit est appelé valeur de décision (VD). Des VD sont calculées pour chaque réplicat généré

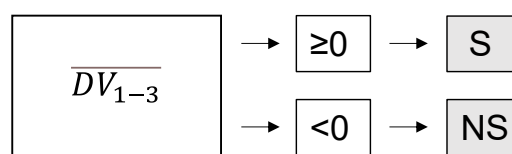
pour les produits chimiques d'essai et les témoins, selon l'équation 2 ci-après :

$$VD = b + \sum_{i=1}^n w_i x_i \quad (2)$$

où n est le nombre de variables (gènes, c'est-à-dire 196 pour GARDskin), b est une constante (le paramètre de biais du SVM), w_i le poids de la variable i et x_i la valeur d'expression génique normalisée de la variable i . Pour un examen approfondi de la manière dont le modèle de prédiction a été défini, il convient de se référer au *Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method* (7).

75. Les VD des trois réplicats individuels servent ensuite d'entrée pour le modèle de prédiction GARDskin. Ce dernier est défini comme suit.

76. Tout produit chimique d'essai pour lequel on a calculé une VD moyenne ≥ 0 est classé comme sensibilisant (catégorie 1 du SGH de l'ONU), tandis que tout produit chimique d'essai pour lequel on a calculé une VD moyenne < 0 est classé comme non-sensibilisant. Une représentation schématique du modèle de prédiction GARDskin est fournie dans le graphique 5.



Graphique 5. Schéma du modèle de prédiction du GARDskin. Les produits chimiques sont classés grâce au signe de la moyenne des trois réplicats d'échantillons biologiques, provenant de trois expériences indépendantes. S: sensibilisant ; NS : non sensibilisant.

Résumé des critères d'acceptabilité

77. Un résumé des critères d'acceptabilité spécifiés pour la méthode GARDskin est proposé ci-dessous.

i) Toutes les expériences d'exposition cellulaire doivent avoir été réalisées avec un lot de cellules SenzaCell satisfaisant aux critères d'acceptabilité du contrôle de la qualité phénotypique (tableau 2). Cela vaut à la fois pour les expériences d'évaluation de la cytotoxicité et pour les expériences de stimulation principale.

ii) Tous les échantillons d'ARN obtenus doivent provenir d'expériences cellulaires remplissant les critères d'acceptabilité du contrôle de la qualité de la viabilité (tableau 4). Cela s'applique à tous les échantillons de produits chimiques d'essai et témoins positifs, négatifs et non stimulés issus des trois expériences de stimulation principale incluses (valides). De même, la ou les expériences d'évaluation de la cytotoxicité à partir desquelles une concentration d'entrée GARDskin est établie doivent satisfaire à tous les critères du contrôle de la qualité de la viabilité (tableau 4).

iii) Tous les échantillons d'ARN obtenus doivent remplir les critères d'acceptabilité du contrôle

de qualité NanoString nCounter® (tableau 5). Cela s'applique à tous les échantillons de produits chimiques d'essai et témoins positifs, négatifs et non stimulés issus des trois expériences de stimulation principale incluses (valides).

iv) La classification finale doit être faite sur la base de trois réplicats biologiques valides satisfaisant tous aux critères d'acceptabilité i-iii.

v) Le témoin positif et le témoin négatif doivent être correctement classés comme sensibilisant et non-sensibilisant, respectivement, par le modèle de prédiction GARDskin.

Rapport d'essai

78. Les informations suivantes doivent être communiquées. Les résultats doivent être présentés sous forme de tableau et inclure, s'il y a lieu, les résultats individuels de chaque expérience réalisée ainsi que les résultats globaux des trois expériences.

Informations générales

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.
- Référence et description de la méthode d'essai utilisée.

Démonstration des compétences

- Déclaration indiquant que l'installation d'essai, avant d'appliquer la méthode d'essai en routine, a démontré sa compétence à la mettre en œuvre en testant les substances d'épreuve de compétence.

Démonstration de la stabilité du système GDAA au fil du temps

- Déclaration spécifiant que les vérifications périodiques et/ou avant utilisation de l'outil GDAA ont été réalisées au moyen d'un ensemble de données historiques et satisfont aux critères requis.

Produit chimique d'essai et témoins

- Source, lot/numéro de lot, date de péremption. Identification chimique : désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants tels que lot/numéro de lot et date de péremption.
- Apparence physique, solubilité dans les solvants selon le cas, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques, selon les données disponibles.
- Déclaration sur la solubilité/l'insolubilité ou la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans les milieux d'exposition.
- Pureté, identité chimique des impuretés, s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent.
- Procédure(s) utilisée(s) pour dissoudre le(s) produit(s) chimique(s) d'essai.
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.
- Solvant (y compris source) utilisé pour chaque produit chimique d'essai et témoin.

Conditions de la méthode d'essai

- Lignée cellulaire utilisée, ID de la culture cellulaire, conditions de stockage et source.
- Composants des milieux cellulaires (y compris source) utilisés dans l'étude.
- Matériel utilisé pour la cytométrie en flux.
- Anticorps et marqueurs de viabilité (y compris source) utilisés dans l'étude.

- Kit d'isolement de l'ARN, kit de qualification de l'ARN et CodeSets NanoString nCounter GARDskin (y compris sources) utilisés dans l'étude.

Résultats des critères d'acceptabilité de l'essai

- Données du contrôle de la qualité phénotypique relatives à chaque expérience (pourcentage de cellules positives pour chaque biomarqueur phénotypique ainsi que viabilité absolue des cellules).
- Données du contrôle de la qualité de la viabilité cellulaire obtenues avec chaque produit chimique d'essai et les témoins négatifs, positifs et non stimulés.
- Données du contrôle de qualité NanoString nCounter (qualité d'imagerie, linéarité, limite de détection et densité de liaison) obtenues avec chaque produit chimique d'essai ainsi que les témoins négatifs et positifs.
- Classification des témoins négatifs et positifs.

Résultats de l'évaluation de la cytotoxicité

- Concentrations d'essai avec justifications.
- Viabilité relative pour chaque concentration du produit chimique d'essai.
- Justification de la concentration d'entrée GARD sélectionnée.

Résultats de la stimulation principale

- Qualité de l'ARN mesurée dans les échantillons d'ARN obtenus avec les produits chimiques d'essai et les témoins.
- Niveaux d'expression génique (contenu des fichiers RCC) pour les produits chimiques d'essai et les témoins, dans un format conforme aux directives disponibles (31)(32).
- Numéro de la version de l'outil GDAA utilisée dans l'étude.
- Déclaration sur la correspondance entre les sommes de contrôle MD5 des fichiers RCC téléchargés vers le logiciel et les sommes de contrôle MD5 du rapport GDAA téléchargé depuis le logiciel.
- Valeurs de décision (échantillons individuels et valeurs moyennes) obtenues pour le produit chimique d'essai et les témoins positifs et négatifs.
- Classification du produit chimique d'essai.
- Description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

Conclusion

Bibliographie

1. WO 2019/057977. Available at:

https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20190328&CC=WO&NR=2019057977A1&KC=A1

2. Larsson K, Lindstedt M, Borrebaeck CA. Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. *Immunology*. 2006;117(2):156-166. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02274.x
3. Hu, Z. B., Ma W., Zaborski, M., MacLeod, R., Quentmeier, H. and Drexler, H.G. (1996). Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia*, 10: 1025-40.
4. Quentmeier, H., Duschl, A., Hu, Z.B., Schnarr, B., Zaborski, M. and Drexler, H.G. (1996). MUTZ-3, a monocytic model cell line for interleukin-4 and lipopolysaccharide studies. *Immunology*, 89: 606-612.
5. Masterson, A.J., Sombroek, C.C., De Gruijl, T.D., Graus, Y.M., van der Vliet, H. J., Loughheed, S.M., van den Eertwegh, A.J., Pinedo, H.M. and Scheper, R.J. (2002). MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood*, 100: 701-703.
6. Johansson, H., Lindstedt, M., Albrekt, A. S. and Borrebaeck, C. A. (2011). A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics*, 12: 399
7. OECD (2022). Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method. Series on Testing and Assessment No. 357: Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
8. Johansson, H., Albrekt, A. S., Borrebaeck, C. A. K. and Lindstedt, M. (2013). The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol In Vitro.*, 27 (3): 1163-9.
9. Johansson, H., Rydnert, F., Kuhn, J., Schepky, A., Borrebaeck, C. and Lindstedt, M. (2014). Genomic allergen rapid detection in-house validation - a proof of concept. *Toxicol Sci.*, 139 (2): 362-70.
10. Forreryd, A., Johansson, H., Albrekt, A. S. and Lindstedt, M. (2014). Evaluation of high throughput gene expression platforms using a genomic biomarker signature for prediction of skin sensitization. *BMC Genomics*, 15 (1): 379.
11. Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., James, J. J., Maysuria, M., Mitton, J. D., Oliveri, P., Osborn, J. L., Peng, T., Ratcliffe, A. L., Webster, P. J., Davidson, E. H., Hood, L. and Dimitrov, K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.*, 26 (3): 317-25.
12. Forreryd, A., Zeller, K. S., Lindberg, T., Johansson, H. and Lindstedt, M. (2016). From genome-wide arrays to tailor-made biomarker readout - Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. *Toxicol In Vitro.*, 37: 177-88.
13. EURL ECVAM. (2018). Genomic Allergen Rapid Detection (GARD) assay for skin sensitization. Report on the GARDskin validation study. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>
14. Johansson, H., Gradin, R., Johansson, A., Adriaens, E., Edwards, A., Zuckerstatter, V., Jerre, A., Burleson, F., Gehrke, H. and Roggen, E. L. (2019). Validation of the GARDskin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicol Sci.*, 170 (2): 374-381
15. ESAC opinion on the scientific validity of the GARDskin and GARDpotency test methods. Available at: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC125963>. DOI: 10.2760/626728

16. Basketter, D.A., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis*, 25 (1): 11-21. doi: 10.1097/DER.0000000000000003. PMID: 24407057..
17. Natsch, A., Ryan, C.A., Foertsch, L., Emter, R., Jaworska, J., Gerberick, F. and Kern, P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J Appl Toxicol*, 33 (11): 1337-52. doi: 10.1002/jat.2868. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23576290.
18. OECD. (2021). Guideline No. 497: Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
19. OECD (2021). Series on Testing and Assessment No. 336: Annex 2 of the Supporting document to the Guideline (GL) on Defined Approaches (DAs) for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
20. Forreryd, A., Gradin, R., Humfrey, C., Sweet, L. and Johansson, H. (2022). Exploration of the GARDskin applicability domain: Indirectly acting haptens, hydrophobic substances and UVCBs. Manuscript in press doi: 10.14573/altex.2201281.
21. Macmillan, D. 2018. GARD Applicability domain project. Supporting document for method peer-review, available online in the Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance (TSAR). Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>
22. Forreryd, A., Gradin, R., Rajapakse, N., Deag, E. and Johansson, H. (2022). The GARD™skin assay: Investigation of the applicability domain for metals. Manuscript in review.
23. Corvaro, M., Henriquez J., Settivari, R., Mattson, U.T., Forreryd, A., Gradin, R., Johansson, H. and Gehen, S. (2022). GARD™skin and GARD™potency: a proof-of-concept study to investigate the applicability domain for agrochemical formulations. Manuscript in preparation.
24. Cortes, C. and Vapnik, V. (1995). Support-Vector Networks. *Machine Learning*, 20 (3): 273-297.
25. OECD. (2016). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring No. 17: Application of GLP Principles to Computerised Systems. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>
26. OECD. (2021). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring No. 22: GLP Data Integrity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>
27. Rivest, R. (1992). The MD5 Message-Digest Algorithm. IETF RCF1321. Available at: <https://www.ietf.org/rfc/rfc1321.txt>
28. EURL ECVAM. (2021). GARDskin Assay Protocol. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/system/files/Published/GARDskin%20Assay%20Protocol%20TSAR.pdf>.
29. OECD. (2018). OECD Series on Testing and Assessment. No 286: Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP). Available at: <https://www.oecd.org/env/guidance-document-on-good-in-vitro-method-practices-givimp-9789264304796-en.htm>
30. Gradin, R., Lindstedt, M. and Johansson, H. (2019). Batch adjustment by reference alignment (BARA): Improved prediction performance in biological test sets with batch effects. *PLoS One*, 14 (2):

e0212669.

31. OECD. (2021). Omics technologies in chemical testing, available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/omics.htm>

32. Harrill, J.A., Viant, M.R., Yauk, C.L., Sachana, M., Gant, T.W., Auerbach, S.S., Beger, R.D., Bouhifd, M., O'Brien, J., Burgoon, L., Caiment, F., Carpi, D., Chen, T., Chorley, B.N., Colbourne, J., Corvi, R., Debrauwer, L., O'Donovan, C., Ebbels, T.M.D., Ekman, D.R., Faulhammer, F., Gribaldo, L., Hilton, G.M., Jones, S.P., Kende, A., Lawson, T.N., Leite, S.B., Leonards, P.E.G., Luijten, M., Martin, A., Moussa, L., Rudaz, S., Schmitz, O., Sobanski, T., Strauss, V., Vaccari, M., Vijay, V., Weber, R.J.M., Williams, A.J., Williams, A., Thomas, R.S. and Whelan, M. (2021) Progress towards an OECD reporting framework for transcriptomics and metabolomics in regulatory toxicology. *Regul Toxicol Pharmacol. Oct*; 125:105020. doi: 10.1016/j.yrtph.2021.105020.

Appendice I. Définitions et abréviations

Les abréviations définies par les concepteurs de la méthode d'essai et/ou propres à certains instruments utilisés par les méthodes GARD sont *en italiques*.

ARE Élément de réponse antioxydant

BARA *Batch Adjustment by Reference Alignment*

Algorithme destiné à éliminer les effets de lot observés entre ensembles de données.

BSA Albumine de sérum bovin

CD Cluster de différenciation

Lot de cellules

Dans le contexte de la présente LD, un lot unique de cellules est défini comme suit :

- *cellules provenant de différents flacons congelés, ou*
- *cellules provenant du même flacon congelé ayant été cultivées séparément. Une division des cultures cellulaires dans le but d'obtenir des lots de cellules distincts doit avoir lieu au plus tôt au 3^e repiquage après décongélation et au plus tard au moins 2 repiquages avant les expériences d'exposition.*

CPTC *Counts-Per-Total-Counts*

Algorithme destiné à la normalisation du contenu en ARN.

DB-ALM Base de données sur les méthodes de substitution à l'expérimentation animale
(DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation)

DMSO Diméthylsulfoxyde

VD Valeur de décision

Résultat quantifiable d'un séparateur à vaste marge.

ESAC Comité scientifique consultatif de l'ECVAM

EURL ECVAM

Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale

SBF Sérum bovin fœtal

FITC Isothiocyanate de fluorescéine

GARD Détection génomique rapide des allergènes (*Genomic Allergen Rapid Detection*)

Série d'essais prédictifs portant sur des effets immunotoxicologiques, sujet principal de la présente Ligne directrice.

GARDskin Méthode d'essai GARD pour la sensibilisation cutanée

Objet spécifique de la présente LD. Méthode utilisée pour l'évaluation du danger de sensibilisation cutanée

Algorithme de prédiction GARDskin

Algorithme fournissant un résultat sous forme de VD à partir des données brutes d'expression génique. La sortie de l'algorithme est ensuite utilisée comme entrée dans le modèle de prédiction. L'algorithme de prédiction GARDskin est un SVM. Voir p. ex. : VD, modèle de prédiction GARDskin, SVM.

Modèle de prédiction GARDskin

Méthode heuristique de classification GARDskin d'un produit chimique ou d'un témoin sur la base des VD tripliquées obtenues pour ce produit ou témoin.

GDA Application d'analyse des données GARD

Logiciel dans le nuage destiné au traitement automatisé et adapté des données et à l'analyse de toutes les données brutes générées avec les méthodes GARD.

SGH Système général harmonisé

GM-CSF Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

SPG Signature de prédiction génomique

Ensemble d'identités géniques constituant collectivement l'ensemble des prédicteurs, dont les valeurs d'expression génique sont utilisées comme données d'entrée dans les modèles de prédiction GARD, c'est-à-dire le(s) SVM propre(s) à l'effet étudié, tous ayant été entraînés de manière appropriée et figés pendant le développement de la méthode d'essai. Chaque méthode GARD (p. ex. GARDskin) destinée à mesurer un effet en particulier fait appel à une signature (SPG) différente.

ELGL Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques

LD Limite de détection

Paramètre des instruments de mesure NanoString.

MD5 Algorithme Message Digest 5

Fonction créant des empreintes numériques des données d'entrée. Dans le contexte de la méthode GARDskin, ces empreintes sont utilisées pour vérifier l'intégrité des données.

OCDE Organisation de coopération et de développement économiques

PBS Tampon phosphate salin

PE Phycoérythrine

IP Iodure de propidium

RCC Reporter Code Count

Type de fichier créé par les instruments de mesure NanoString. Stocke les données brutes d'expression génique.

RIN Numéro d'intégrité de l'ARN

Paramètre de qualité de l'ARN utilisé par l'instrumentation Agilent.

SVM Séparateur à vaste marge

Modèle de prédiction fondé sur des algorithmes d'apprentissage supervisé, qui analyse les données à des fins de classification et d'analyse de régression.

LD Ligne directrice

Appendice II. Limites connues de la méthode GARDskin

Tableau All.1. Synthèse des limites connues de la méthode GARDskin et adaptations possibles

Classe de substances / interférence	de Conséquence possible de l'interférence	de Adaptations possibles	Exemple de substance
Produits chimiques d'essai absorbant la lumière et/ou autofluorescents aux longueurs d'onde de la détection de l'IP.	Susceptible d'influencer les résultats de l'évaluation de la cytotoxicité et de conduire à une mauvaise définition des concentrations d'entrée GARD.	Peut être évitée en utilisant d'autres réactifs pour l'évaluation de la cytotoxicité s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir des résultats équivalents à ceux des méthodes proposées ici.	Citral (n° CAS 5392-40-5)
Substances sans masse moléculaire précise connue. Un produit chimique d'essai est de préférence défini par une masse moléculaire connue, la molarité permettant de déterminer des concentrations d'entrée GARD appropriées.	Susceptible de conduire à des concentrations d'entrée GARD inappropriées, ce qui peut ensuite entraîner des classifications erronées.	Pour contourner ce problème : - Utiliser des concentrations en masse (p. ex. ppm) (1). Une grande majorité de sensibilisants cutanés sont détectés à des concentrations < 100 ppm (1). - Estimer la masse moléculaire apparente du mélange complexe.	Produits UVCB, émissions de produits chimiques, produits ou mélanges de composition variable ou incomplètement connue, extraits naturels.
Produits chimiques d'essai ne pouvant être dissous dans un solvant approprié à une concentration finale dans les puits de 500 µM et ne présentant pas de propriétés cytotoxiques à la concentration maximale étudiée.	Une concentration d'exposition suffisante pour la détection des sensibilisants cutanés faibles n'est pas garantie. Peut entraîner des faux négatifs. Cependant, les données disponibles suggèrent qu'une grande majorité de sensibilisants cutanés sont détectés à des concentrations < 100 µM (1).	Les produits chimiques d'essai n'induisant pas de cytotoxicité à une concentration soluble maximale inférieure à 500 µM peuvent faire l'objet d'une analyse plus approfondie, conformément aux procédures GARDskin en aval, et les résultats positifs de ces essais peuvent être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané.	n/d
Produits chimiques	L'insolubilité ou l'interférence	Si des fondements scientifiques	n/d

d'essai incompatibles avec les véhicules.	réactionnelle avec le produit chimique d'essai est susceptible de conduire à des concentrations d'entrée GARD inappropriées et à des classifications erronées, ou se traduire par une incompatibilité complète avec la méthode.	existent, il est possible de recourir à d'autres véhicules compatibles (2-3). La compatibilité de ces véhicules doit être confirmée par l'utilisation du véhicule blanc comme témoin négatif à des concentrations d'exposition identiques. Si un produit chimique d'essai demeure insoluble, il convient de se référer à la section relative à la manipulation des produits chimiques d'essai insuffisamment dissous ci-dessus.
Produits chimiques d'essai s'hydrolysant rapidement dans le système cellulaire.	Une concentration suffisante des produits chimiques d'essai dans les puits n'est pas garantie. Peut entraîner des faux négatifs.	Hydrazine (n° CAS 2644-70-4)

Bibliographie

1. Gradin, R., Forreryd, A., Mattson, U., Jerre, A. and Johansson, H. (2021). Quantitative Assessment of Sensitizing Potency using a dose-response adaptation of GARDskin. *Sci. Rep.*, 176 (2): 423-432.
2. Forreryd, A., Gradin, R., Humfrey, C., Sweet, L. and Johansson, H. (2022). Exploration of the GARDskin applicability domain: Indirectly acting haptens, hydrophobic substances and UVCBs. Manuscript in review.
3. Corvaro, M., Henriquez J., Settivari, R., Mattson, U.T., Forreryd, A., Gradin, R., Johansson, H. and Gehen, S. (2022). GARD™skin and GARD™potency: a proof-of-concept study to investigate the applicability domain for agrochemical formulations. Manuscript in preparation.

Appendice III. Substances d'épreuve de compétence

Tableau AIII.1. Substances à utiliser pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode GARDskin

ID du produit chimique	N° CAS	Etat physique	Classification de référence ¹			Valeurs (DV) (gamme de référence)	GARDSkin (concentration de départ, µM)
			ELGL	Données humaines	Classification		
Bromure de 4-nitrobenzyle	100-11-8	Solide	S (extrême)	ND	S	(0-10)	<25
Gallate de propyle	121-79-9	Solide	S (fort)	ND	S	(2-13)	25-400
Isoeugénol	97-54-1	Liquide	S(modéré)	S	S	(2-13)	>100
3-(Diméthylamino)-1-propylamine	109-55-7	Liquide	S (modéré)	ND	S	(0-11)	>250
Eugénol	97-53-0	Solide	S (faible)	S	S	(0-10)	>100
Diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liquide	S (faible)	ND	S	(2-20)	>25
Glycérol	56-81-5	Liquide	NS	ND	NS	(<0)	≥250
Hexane	110-54-3	Liquide	NS	NS	NS	(<0)	≥125
1-Butanol	71-36-3	Liquide	NS	ND	NS	(<0)	≥250

¹ Extrait de l'Annexe 2 du document de support de la LD 497, OCDE (12).1)S : sensibilisant ; NS : non sensibilisant, ND : non disponible.

Bibliographie

1. OECD (2021). Series on Testing and Assessment No. 336: Annex 2 of the Supporting document to the Guideline (GL) on Defined Approaches (DAs) for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>