



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

« **Toxicité Cutanée Subchronique :**
Étude sur 90 Jours »

1. INTRODUCTION

• Connaissances requises

- Substance à tester solide ou liquide
- Identification chimique de la substance à tester
- Pureté (impuretés) de la substance à tester
- Caractéristiques de solubilité
- pH (le cas échéant)
- Stabilité, y compris la stabilité dans un véhicule le cas échéant
- Point de fusion/d'ébullition

• Documents de référence

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

2. MÉTHODE

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

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

• Définitions

La toxicité cutanée subchronique est l'ensemble des effets néfastes se produisant chez des animaux d'expérience pendant une partie de leur durée de vie (n'excédant pas 10%) et résultant de l'application répétée et quotidienne d'une substance chimique par voie cutanée.

Dans un essai par voie cutanée, la dose est la quantité de substance à tester qui est appliquée sur la peau (appliquée quotidiennement lors d'essais subchroniques). La dose s'exprime en poids (g, mg) ou en poids de substance à tester par unité de poids d'animal d'expérience (par exemple mg/kg)

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

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

La toxicité cumulative est l'effet néfaste de doses répétées résultant, soit de l'action prolongée ou de l'augmentation de concentration de la substance ou de ses métabolites sur les tissus sensibles.

- Principe de la méthode

La substance à tester est administrée quotidiennement, à différents niveaux de doses, sur la peau de plusieurs groupes d'animaux d'expérience à raison d'un niveau de dose par groupe et ce, pendant une période de 90 jours. Au cours de la période d'application de la substance, on observe journallement les animaux de manière à déceler toute manifestation éventuelle de toxicité. Les animaux qui meurent au cours de l'expérience sont autopsiés ; ceux qui restent en vie à l'issue de celle-ci sont sacrifiés et autopsiés.

B. MODE OPÉRATOIRE

- Préparations

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

- Animaux d'expérience

Choix des espèces

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

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

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

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

Nombre et sexe

Au minimum 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) ayant une peau saine doivent être utilisés pour chaque niveau de dose. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux en cours d'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être traité à l'aide du plus haut niveau de dose pendant 90 jours et être ensuite soumis à une observation ayant trait au caractère réversible, à la persistance ou à l'apparition différée d'effets toxiques et ce, pendant une période de durée appropriée généralement non inférieure à 28 jours, après administration du traitement.

Conditions d'encagement et d'alimentation

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

• Conditions expérimentales

Niveaux de dose

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

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

Essai-limite

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

Observations

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

• Exécution de l'essai

Les animaux sont mis en contact avec la substance à tester, idéalement pendant au moins 6 heures par jour, à raison de 7 jours par semaine, pendant une période de 90 jours. Toutefois, pour des raisons essentiellement pratiques, une application à raison de 5 jours par semaine est considérée comme acceptable. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures doivent être gardés pendant une période complémentaire de 28 jours sans traitement pour contrôler la disparition ou la persistance des effets toxiques.

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

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

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

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

• Examens cliniques

Les examens suivants doivent être effectués :

- (a) Examen ophthalmologique, en utilisant un ophtalmoscope ou un appareil équivalent convenable, qui doit être effectué avant l'exposition à la substance d'essai et à la fin de l'étude, de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur le groupe de contrôle et le groupe traité à haute dose. Tous les animaux doivent être examinés si on décèle des changements dans les yeux.
- (b) Au terme de la période d'essai, il y a lieu d'effectuer les examens suivants : hématologie, y compris l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le comptage des érythrocytes, la numération-formule sanguine ainsi qu'une détermination du potentiel de coagulation telle que le temps de coagulation, le temps de prothrombine, le temps de thromboplastine ou le comptage des plaquettes.
- (c) La détermination de la biochimie clinique du sang doit être effectuée au terme de la période d'essai. Les domaines d'essai généralement considérés comme adéquats à toutes les études sont : l'équilibre électrolytique, le métabolisme des hydrates de carbone, le foie et la fonction rénale. La sélection d'essais spécifiques sera influencée par des observations relatives au mode d'action de la substance. Les déterminations suggérées sont les suivantes : calcium, phosphore, chlorure, sodium, potassium, glycémie à jeun (avec période de jeûne adaptée à l'espèce), transaminase glutamique-pyruvique sérique*, transaminase glutamino-oxaloacétique sérique**, ornithine décarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, azote uréique, albumine, créatinine du sang, bilirubine totale et protéines sériques totales. Parmi les

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

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

autres déterminations pouvant s'avérer nécessaires pour une évaluation toxicologique appropriée figurent l'analyse des lipides, des hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine et l'activité cholinestérasique. Le cas échéant, des analyses biochimiques cliniques complémentaires peuvent être effectuées en vue d'approfondir l'étude des effets observés.

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

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

- A n a t o m o - p a t h o l o g i e

Autopsie générale

Tous les animaux doivent être soumis à une autopsie générale complète qui comportera l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices, des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Le foie, les reins, la rate, les capsules surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide, aussitôt que possible après dissection, pour éviter leur dessiccation. Les organes et tissus suivants doivent être conservés dans un milieu approprié au cas où un examen histopathologique s'avérerait nécessaire : tous les organes présentant des lésions macroscopiques, cerveau, y compris tronçons de la moelle/du pont, cortex cérébelleux et cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, thymus (trachée), poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, capsules surrénales, pancréas, gonades, organes génitaux auxiliaires, vésicule biliaire (si présente), œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon, rectum, vessie, ganglion lymphatique représentatif (glandes mammaires femelles) (musculature de la cuisse), nerf périphérique (yeux), (sternum avec moelle osseuse), (fémur - y compris la surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux - cervical, milieu du thorax et lombaire) et (glandes lacrymales accessoires). (Les tissus indiqués entre parenthèses ne doivent être examinés que si des signes de toxicité ou de mise en cause de l'organe cible en indiquent la nécessité.)

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

Histopathologie

- (a) Un examen histopathologique complet doit être effectué sur la peau traitée et non traitée ainsi que sur les organes et les tissus de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe exposé au niveau de dose le plus élevé.
- (b) Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.
- (c) Les organes cibles des groupes soumis à d'autres niveaux de dose doivent être examinés.
- (d) Lorsqu'on utilise des rats, les poumons des animaux des groupes traités avec des doses basses et intermédiaires doivent être soumis à un examen histopathologique en vue de déceler toute trace d'infection, cet examen donne en effet une évaluation aisée de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques peuvent ne pas être requis d'une manière routinière sur les animaux de ces groupes, mais ils doivent toujours être effectués sur les organes qui ont laissé apparaître des signes de lésion dans le groupe du niveau de dose le plus élevé.
- (e) Lorsqu'un groupe satellite est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique sur les tissus et les organes qui ont laissé apparaître des effets dans d'autres groupes de traitement.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

- Traitement des résultats

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

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

- Evaluation des résultats

Les résultats d'une étude de toxicité cutanée subchronique doivent être évalués conjointement avec les résultats d'études précédentes et être interprétés en fonction des effets toxiques observés, des résultats d'autopsie et des résultats histopathologiques. L'évaluation comportera le rapport entre, d'une part, le niveau de dose de la substance à tester et, d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les anomalies comportementales et cliniques, les lésions graves, les organes cibles identifiés, les changements de poids corporel, les effets sur le taux de mortalité et tout autre effet toxique général ou spécifique. Une étude subchronique correctement menée doit fournir une estimation satisfaisante du niveau sans effet.

- Rapport

Le rapport doit contenir les renseignements suivants :

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

**« Toxicité Cutanée Subchronique :
Étude sur 90 Jours »**

• Interprétation des résultats

Une étude de toxicité cutanée subchronique fournira des renseignements sur les effets de l'exposition répétée à une substance par voie cutanée. L'extrapolation à l'homme des résultats de cette étude n'a de valeur que dans une mesure limitée, mais elle peut donner des indications utiles sur le degré d'absorption percutanée de la substance, sur les niveaux sans effet et sur le niveau d'exposition admissible chez l'être humain.

4. BIBLIOGRAPHIE

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