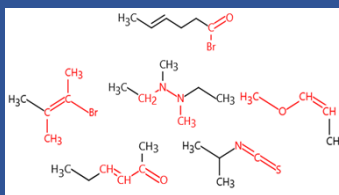
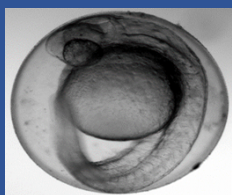
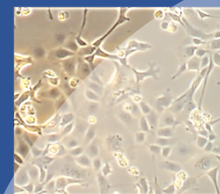


LES INFORMATIONS DE LA COORDINATION NATIONALE POUR LES LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE



Ineris - 213379 - 2788366 - v.1.0

DECEMBRE 2023

Éditorial

Les propositions de nouveaux sujets sont désormais connues et ont été communiquées aux Coordinateurs Nationaux des différents Pays Membres pour évaluation. Ceux-ci doivent désormais se positionner sur la pertinence de développer ces thématiques et de définir leurs niveaux d'implication respectifs. Les retours doivent être transmis au secrétariat du programme des lignes directrices de l'OCDE pour le 15 janvier 2024. Le nombre de sujets, présentés ci-dessous par catégories de documents et/ou d'actions, est très important cette année (27).

Les propositions relatives à la section 4 « Effets sur la santé » restent toujours majoritaires et notamment les propositions de révisions de lignes directrices existantes pour intégrer de nouvelles méthodes « me-too ». Il est également important de souligner les différents projets pour évaluer les dangers des pesticides sur les espèces de pollinisateurs autres que les abeilles mellifères.

Ces propositions de projets et le nombre actuel de projets déjà inscrits dans le programme de travail appellent à une réflexion sur la priorisation des projets nouveaux et existants. En premier lieu, le Secrétariat propose de classer les projets par niveau de ressources impliquées afin d'intégrer ce paramètre dans la sélection des projets. Puis, pour les projets existants, un examen approfondi du plan de travail sera réalisé lors du prochain WNT afin de réfléchir à la signification et aux implications d'avoir un projet sur le plan de travail en ce qui concerne : la maturité de la proposition, la ressource (dans le pays/au Secrétariat), les délais, le rôle et implication du Coordonnateur National et les actions à mettre en œuvre quand il n'y a pas d'activité pendant 2 années successives.

Dans le cadre de cette lettre d'information, la coordination nationale attire aussi votre attention sur les bonnes pratiques à respecter pour la soumission de nouveaux projets. En effet, une proposition transmise tardivement aux coordinateurs pour soumission au Secrétariat ne permet pas d'élaborer un projet abouti et conduit, la plupart du temps, à une acceptation controversée ou un rejet. Il est donc essentiel d'informer la coordination nationale le plus en amont possible de la volonté de soumettre un projet, dont la date limite est fixée au 15 novembre de chaque année.

→ Nouveaux sujets proposés

NOUVELLES LIGNES DIRECTRICES

- **Test de toxicité orale aiguë sur les abeilles maçonnes solitaires (*Osmia sp.*)** (Pilotes : Finlande, Suisse)

Différents rapports ont fait état, ces dernières années, d'un déclin de certaines espèces de pollinisateurs dans plusieurs régions du monde. Les facteurs potentiels associés à ces déclins comprennent la destruction de l'habitat, les ravageurs, certaines pratiques agricoles, les pratiques de gestion des abeilles, les agents pathogènes, le changement climatique, la nutrition et les pesticides.

En 2009, l'OCDE a mené une enquête sur les essais, la recherche, l'atténuation et la gestion de l'information concernant les pollinisateurs et a publié un rapport ENV/JM/MONO(2010)24 montrant la nécessité de réaliser des essais de toxicité en laboratoire sur des adultes d'espèces d'abeilles solitaires n'appartenant pas au genre *Apis*. De plus, le développement de l'essai proposé a été identifié par le groupe d'experts de l'OCDE sur les effets des pesticides sur les insectes pollinisateurs comme une activité hautement prioritaire.

Un protocole de test de toxicité orale aiguë est déjà disponible dont la faisabilité et la reproductibilité ont déjà été démontrées lors de plusieurs essais circulaires (le rapport de l'étude de validation devrait être finalisé prochainement). L'ensemble de ces éléments permet d'envisager une adoption rapide de cette ligne directrice.

- **Essai de toxicité chronique pour les abeilles solitaires (*Osmia spp.*)** (Pilotes : Espagne, Italie)

Les abeilles solitaires diffèrent des abeilles sociales en termes de voies et de niveaux d'exposition, et sont plus sensibles que les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) à divers pesticides. Pour ces raisons, l'évaluation des risques doit aller au-delà des abeilles domestiques et intégrer les abeilles solitaires.

Compte tenu d'une exposition aux résidus de pesticides pendant des longues périodes, il est essentiel d'intégrer des tests d'exposition chronique dans les systèmes d'évaluation des risques en complément des essais aigus. Les protocoles actuels d'exposition chronique pour les abeilles domestiques ne peuvent pas être directement appliqués aux abeilles solitaires.

Le projet hispano-italien propose un protocole standardisé adapté à la biologie et au comportement des abeilles solitaires. Ce protocole, dont la faisabilité et la reproductibilité ont été démontrées, devrait contribuer à une évaluation plus complète des impacts des pesticides sur les pollinisateurs.

- **Test de toxicité orale chronique (10 jours) chez le Bourdon (*Bombus spp. L.*)** (Pilote : Espagne)

Le document publié et déjà révisé de l'EFSA sur l'évaluation des risques des produits phytopharmaceutiques sur les pollinisateurs inclut également les bourdons en complément des abeilles solitaires et des abeilles mellifères. En raison de la nécessité d'examiner les effets à long terme sur les bourdons, le groupe de travail Non-*Apis* de la Commission internationale pour les relations plantes-pollinisateurs (I.C.P.P.R.) a développé un protocole permettant d'évaluer l'exposition chronique par voie orale de premier niveau pour les bourdons. Sur la base de la ligne directrice 245 de l'OCDE pour les essais sur 10 jours des abeilles et de la ligne directrice 247 de l'OCDE pour la toxicité orale aiguë des bourdons, un essai d'une durée de 10 jours a été développé et validé en utilisant le diméthoate comme substance de référence.

La faisabilité et la reproductibilité de la méthode proposée ont été démontrées et vérifiées par deux essais circulaires. Un rapport de validation est en cours de préparation et sera bientôt disponible pour être évalué dans le cadre du développement de cette ligne directrice.

- **Essai de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42** (Pilote : Japon)

Le Japon propose de publier une ligne directrice basée sur le document guide 231 de l'OCDE et portant sur l'essai de transformation cellulaire *in vitro* Bhas 42. Cette méthode d'essai a conduit au déclenchement de l'activité sur les approches intégrées d'essais et d'évaluation pour les cancérigènes non génotoxiques à l'OCDE et constitue un test décisif pouvant fournir des éléments de preuves pour relier des résultats *in vitro* à l'hyperplasie *in vivo*.

Depuis la publication du document guide 231 en 2017, les experts japonais ont collecté des données sur le mécanisme de transformation cellulaire et différents articles ont été publiés sur cet aspect. Le Japon appuie ce passage vers l'adoption d'une ligne directrice par la disponibilité de ces éléments mécanistiques et des besoins réglementaires croissants en matière de détection des substances cancérigènes non génotoxiques.

- **Évaluation fluorométrique de l'activité de liaison à la transthyréline basée sur le déplacement de la thyroxine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine : Essai de liaison FITC-T4 à la TTR** (Pilotes : Pays-Bas, France)

Ce projet proposé conjointement par les Pays-Bas et la France (plateforme PEPPER) propose d'élaborer une ligne directrice pour l'essai de liaison FITC-T4 à la TTR (Thyroxine-binding prealbumin) qui s'inscrit au niveau 2 du cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

Cette méthode a déjà été évaluée dans le cadre du réseau NETVAL de l'UE pour la pré-validation des tests thyroïdiens. Le groupe d'experts de l'OCDE sur les méthodes de perturbation de la thyroïde a aussi évalué positivement ce test de liaison FITC-T4 à la TTR, le jugeant sensible, spécifique et reproductible.

Les experts ont reconnu que la liaison à la TTR était un événement moléculaire initiateur pertinent pour l'identification et la caractérisation des perturbateurs du système hormonal thyroïdien et ont recommandé de poursuivre la validation en organisant une étude de transférabilité dans au moins un autre laboratoire, suivie d'un test en aveugle d'un sous-ensemble sélectionné des 30 produits chimiques testés dans le cadre de l'étude EU-NETVAL de validation complète.

Cette ligne directrice devrait faciliter l'évaluation des produits chimiques qui agissent sur le système hormonal thyroïdien en déplaçant la thyroxine de la transthyréline et pourra être utilisée pour l'identification des dangers chimiques ainsi que dans le cadre d'une stratégie d'essai *in vitro* plus complète portant sur d'autres événements clés sur d'autres événements clés et réseaux AOP liés au système hormonal thyroïdien.

- **Évaluation colorimétrique de l'activité des déiodinases de type 1 basée sur la réaction de Sandell-Kolthoff avec des microsomes humains : l'essai DIO1-SK** (Pilotes : France, Allemagne)

L'objectif de cette proposition conjointe : France / Allemagne, portée par la plateforme PEPPER, est de développer une ligne directrice basée sur le "test d'activité de la déiodinase de type 1 basé sur la réaction de Sandell-Kolthoff avec des microsomes humains" (test DIO1-SK) qui relève du niveau 2 du cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. La méthode a déjà été évaluée dans le cadre du projet NETVAL de l'UE pour la pré-validation des essais thyroïdiens et les aspects concernant sa transférabilité, sa reproductibilité ainsi que sa prédictibilité ont été partiellement démontrées et ils seront approfondis lors du déroulement du projet.

Les résultats de ce projet permettront de faciliter l'évaluation des produits chimiques agissant sur le système hormonal thyroïdien en modulant l'activité de la déiodinase de type 1 humaine et peuvent être utilisées pour l'identification des dangers chimiques ainsi que dans le cadre d'une stratégie d'essai *in vitro* plus complète portant sur d'autres événements clés sur d'autres événements clés et réseaux AOP liés au système hormonal thyroïdien.

- **Evaluation de la toxicité, de la pathogénicité et de l'infectiosité des pesticides microbiens par voie orale, voie cutanée, par inhalation et par injection** (pilotes : Etats-Unis, Canada)

L'évaluation des dangers pour les mammifères liés aux pesticides microbiens nécessite de disposer de lignes directrices spécialisées qui évaluent non seulement la toxicité, mais également l'infectiosité et la pathogénicité. L'USEPA a élaboré des lignes directrices pour l'évaluation des dangers par voie orale, cutanée, par inhalation et par injection, et de nombreux pays acceptent les données générées à l'aide de ces lignes directrices. Cependant, d'autres pays exigent ou préfèrent que les évaluations des dangers soient effectués conformément à des méthodes d'essais établies au niveau international. L'EPA a publié ses lignes directrices en 1996, et elles sont généralement robustes ; cependant, au cours des décennies précédentes d'utilisation, la nécessité de mises à jour mineures est apparue évidente.

L'objectif de ce projet est donc d'adapter les lignes directrices de l'EPA pour les tests sur les mammifères (lignes directrices 885.3050, 885.3100, 885.3150, 885.3200), avec les mises à jour nécessaires, en une seule ligne directrice de l'OCDE, afin de favoriser l'harmonisation des tests de toxicité/pathogénicité/infectivité chez les mammifères entre les pays de l'OCDE.

RÉVISION DE LIGNES DIRECTRICES EXISTANTES

- **Ligne directrice 309 « Minéralisation aérobique dans les eaux de surface - Essai de biodégradation par simulation »** (Pilote : Royaume-Uni)

Le Royaume-Uni souhaite réviser la ligne directrice de l'OCDE 309, et certains éléments de cette révision feront l'objet d'un document d'orientation accompagnant cette ligne directrice. Il s'agit notamment de recommandations relatives à l'échantillonnage et au stockage de l'inoculum, ainsi que des variations autorisées dans le plan d'expérience.

La révision proposée est nécessaire pour s'aligner avec les pratiques réglementaires actuelles et sont corroborées par des données expérimentales. Ces éléments ont été compilés à partir de la littérature scientifique et d'études expérimentales supplémentaires réalisées dans le cadre d'un projet Cefic (Cefic-LRI ECO55) qui prévoit également l'organisation d'un essai circulaire inter-laboratoires.

Cette révision, qui a pour objectif d'accroître la qualité et la pertinence environnementale des données générées et améliorer la robustesse globale de la ligne directrice, permettra :

1. d'affiner les conditions d'échantillonnage et de stockage (durée et température) de l'inoculum avant le début de l'essai ;
2. d'affiner les critères de validité de la substance de référence existante en tenant compte des essais à des températures plus basses ;
3. d'inclure de nouvelles substances de référence pour évaluer la viabilité de l'inoculum et faciliter l'évaluation comparative de la dégradation des substances d'essai ;
4. de décrire l'influence que les variations autorisées du dispositif expérimental peuvent avoir sur la dégradation des substances d'essai.

▪ **Ligne directrice 403 « Toxicité aiguë par inhalation »** (Pilote : Royaume-Uni)

Cette proposition de révision a été élaborée à la suite d'échanges avec les États-Unis, qui ont mis en évidence que la suppression de la LD 403 pourrait conduire à des nouveaux essais sur les animaux (par exemple, répéter les essais en utilisant les lignes directrices alternatives) et, notamment, à la réalisation d'essais pour des produits chimiques déjà réglementés.

Pour pallier ce problème potentiel, le Royaume-Uni propose une révision mineure de la TG 403, concernant l'estimation de la concentration létale 50 % pour les études d'inhalation aiguë, afin de donner la possibilité d'orienter les études vers des alternatives appropriées, plus raffinées et qui raccourcissent la durée de l'essai tout en utilisant moins d'animaux (conformément aux lignes directrices 433 et 436).

Texte proposé :

La ligne directrice 403 ne doit être réalisée qu'en dernier recours, après avoir analysé toutes les informations existantes. Si des essais in vivo sont nécessaires, il convient d'envisager le recours à d'autres études d'inhalation aiguë qui utilisent moins d'animaux et des critères d'évaluation plus précis (TG 433 et TG 436). Au moment de la rédaction de cette mise à jour de la LD 403, il existe des cas où la version actuelle de la ligne directrice peut encore être nécessaire ou exigé par certaines autorités réglementaires. Il convient de noter que les données générées à partir des versions précédentes de cette ligne directrices sont encore valides.

▪ **Raffinement de la ligne directrice 420 pour l'évaluation de la toxicité orale aiguë afin d'inclure les signes évidents de toxicité** (Pilote : Royaume-Uni)

La "toxicité évidente" (symptômes clairs indiquant que l'exposition à une dose plus élevée entraînerait la mort) a été adoptée comme critère d'évaluation dans la TG 420 en 2001. Toutefois, la subjectivité qui entoure l'interprétation de ce critère peut limiter une utilisation étendue de ce critère de raffinement.

Pour rendre plus explicite cette définition, des données historiques d'études de toxicité aiguë par voie orale ont été analysées pour identifier les symptômes cliniques détectables en correspondance de la dose la plus faible et capables de prédire un décès à la dose la plus élevée. Ces données ont été utilisées pour élaborer des préconisations pour la reconnaissance d'une toxicité évidente pouvant être intégrées dans la ligne directrice 420, afin de pouvoir permettre une prise de décision objective concernant les tests à des doses élevées, réduisant ainsi les souffrances et le nombre d'animaux utilisés.

Ces préconisations sont détaillées dans l'article de Sewell et al « New supporting data to guide the use of evident toxicity in acute oral toxicity studies (OECD TG 420) » (PMID: 37838350).

▪ **Ligne directrice 431 « Corrosion cutanée *in vitro* : Essai sur modèle de peau humaine »** (Pilote : Corée)

Cinq modèles d'épiderme humain reconstitué (RhE) sont actuellement disponibles pour la ligne directrice 431, mais un seul modèle a été développé en Asie. Ainsi, les utilisateurs de cette ligne directrice dans de nombreux pays asiatiques sont souvent confrontés à des problèmes logistiques et à des coûts d'essais élevés. Pour pallier ce problème, la Corée propose d'intégrer le test de corrosion cutanée *in vitro* KeraSkin™ (KeraSkin™ SCT) en tant que méthode « me-too » dans la ligne directrice 431, dont l'utilisation a déjà été approuvée dans le cadre de la ligne directrice 439 sur l'irritation cutané.

La Corée remarque aussi que, du point de vue de l'utilisateur, il serait plus rapide et plus économique d'effectuer en parallèle une évaluation de la corrosivité et de l'irritation avec un seul modèle. C'est dans ce contexte que le KeraSkin™ SCT a été développé et que l'étude de validation est en cours conformément aux standards de performance définis (document n°219 « Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods for Skin Corrosion Testing as described in TG 431 »).

▪ **Ligne directrice 442C « Sensibilisation cutanée *in chemico* »** (Pilote : Etats-Unis)

L'objectif de cette proposition de révision, soumise par les Etats-Unis, est d'évaluer le test *in chemico* de criblage des allergènes électrophiles (EASA) en vue de son inclusion dans la ligne directrice 442C en tant que méthode « me-too ». L'EASA est une méthode efficace de criblage à moyen débit, pour évaluer le premier événement clé dans le parcours d'effet néfaste (AOP) de la sensibilisation cutanée. Cet essai sur plaques fournit un résultat pour la sensibilisation cutanée basé sur le danger, en utilisant un signal de sortie colorimétrique ou fluorescent ; il évalue les mêmes caractéristiques électrophiles que les essais DPRA et l'ADRA.

▪ **Ligne directrice 442D « Sensibilisation cutanée *in vitro* »** (Pilotes : France, Japon)

Depuis la publication par l'OCDE du parcours d'effet néfaste (AOP) pour la sensibilisation cutanée, plusieurs méthodes basées sur la modélisation des événements clés de l'AOP ont été validées et intégrées dans les TG 442C, D et E.

En 2023, le JaCVAM a validé scientifiquement la méthode EpiSensa en vue de son intégration dans le TG 442D. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un modèle d'épiderme humain reconstruit (RhE) comme système expérimental. Le rapport de validation fait état de la performance prédictive de cette méthode pour les pré/pro-haptènes et pour les substances lipophiles. Ces capacités permettent de surmonter certaines des limites des méthodes existantes ; de ce fait, cette méthode représente une amélioration importante en termes d'applicabilité à certaines substances "difficiles à tester" avec des propriétés physico-chimiques particulières (c'est-à-dire des composants peu solubles dans l'eau) ou des substances de composition inconnue ou variable (UCVB).

Compte tenu des applications attendues de cette méthode, il semble important de faciliter et de garantir son accès dans la majorité des pays membres de l'OCDE. C'est pourquoi, en plus du modèle actuellement disponible au Japon, la France propose d'effectuer la validation d'une méthode similaire en utilisant un autre modèle RhE (MaTtek EpiDerm™). Comme dans le cas de la ligne directrice 439, l'inclusion d'au moins deux modèles RhE dans la future ligne directrice garantira que ces méthodes seront immédiatement disponibles pour tous les utilisateurs potentiels dans les États membres de l'OCDE.

▪ **Mise à jour des lignes directrices 442C, 442D et 442E sur la sensibilisation cutanée utilisées dans le cadre de la ligne directrice 497 sur les approches définies** (Pilote : Secrétariat OCDE)

Il est proposé de mettre à jour les sections « introduction générale » des lignes directrices 442C, 442D et 442E afin d'assurer une cohérence entre ces lignes directrices, en particulier lorsqu'une méthode individuelle est liée à une approche définie. C'est le cas des plages de valeurs limites qui sont déterminées à partir des données générées par les méthodes individuelles, mais qui sont utilisées dans le contexte de l'approche définie. Le projet consiste à introduire la notion de plages limites dans l'expression des résultats d'essais de méthodes individuelles de sensibilisation cutanée.

Il s'agirait d'introduire dans les sections « introduction générale » une phrase de ce type : « *Si l'intention est d'utiliser les données de ces méthodes dans le cadre d'une approche définie pour la sensibilisation cutanée, il convient de se référer à la ligne directrice 497 pour l'application des plages de valeurs limites ou d'autres procédures d'interprétation des données* ».

▪ **Ligne directrice 443 « Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération »** (Pilotes : Commission Européenne, Danemark, Pays-Bas)

L'ECHA a finalisé une analyse rétrospective des études étendues de toxicité pour la reproduction sur une génération à la demande de la Commission européenne et de l'OCDE. Les principaux objectifs du projet étaient les suivants :

- Évaluer la performance de la ligne directrice 443 de l'OCDE telle qu'elle est mise en œuvre dans REACH, et sa capacité à fournir des informations pertinentes pour l'évaluation des dangers ;
- Évaluer les aspects spécifiques de la performance des études étendues de toxicité pour la reproduction sur une génération disponibles dans les dossiers d'enregistrement REACH en ce qui concerne la conception, la conduite et les résultats notifiés.

Le rapport final du projet a été publié en mars 2023 et, sur la base de ses conclusions, il apparaît qu'une révision de cette ligne directrice est nécessaire. Les modifications à apporter concernent des clarifications et des précisions sur la méthodologie, les paramètres à évaluer ou sur la manière dont les données doivent être rapportées. Cette révision ne portera que sur les problématiques identifiées par le rapport de l'ECHA et il n'est pas proposé de réviser d'autres sections du document.

En parallèle, il a aussi été observé qu'il serait nécessaire d'inclure dans le document guide 151 des orientations supplémentaires concernant la Cohorte 3, la description des critères utilisés pour identifier le nombre de follicules, et des orientations plus pertinentes sur la manière de mesurer la rétention du mamelon et la distance anogénitale dans les études sur les rongeurs.

- **Ligne directrice 455 « Ligne directrice axée sur la performance pour les essais *in vitro* de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des oestrogènes »** (Pilote : Royaume-Uni)

Le Royaume-Uni a porté à l'attention des coordinateurs nationaux des problèmes identifiés lors de l'application des critères de classification dans la ligne directrice 455. En effet, en 2022-2023, l'examen du rapport de validation de l'ICCVAM et la comparaison des données entre le rapport de validation et la version finale de la ligne directrice ont révélé des incohérences dans le système de classification utilisé pour les substances chimiques de compétence négatives.

Le Royaume-Uni a notifié aussi le fait qu'un certificat d'analyse était requis d'urgence pour la lignée cellulaire VM7Luc4E2 et qu'en 2016, la ligne directrice 455 a été révisée en ce qui concerne le protocole BG1Luc, en raison d'une lignée cellulaire mal identifiée, avec l'identification d'une contamination croisée avec une lignée cellulaire MCF7 datant d'il y a plus de 30 ans. Bien que les informations sur la lignée cellulaire et le changement de nom soient désormais corrigés dans la version actuelle et qu'à l'époque (2016) la lignée cellulaire ait été considérée comme n'ayant pas d'incidence sur le résultat de la méthode d'essai en ce qui concerne l'activité œstrogénique, il existe certaines différences mécanistiques. En effet, la lignée cellulaire VM7Luc contient ER α , mais pas ER β , et il est également très probable qu'elle contienne de l'aromatase.

Cette observation pourrait également expliquer certains des résultats discordants de l'étude de validation initiale pour le laboratoire financé l'ECVAM et certains tests effectués par XDS (le dépositaire japonais de la lignée cellulaire), qui n'ont pas été pris en compte à l'époque.

Sur la base de l'ensemble de ces éléments, le Royaume-Uni propose de réviser le protocole VM7LUC dans la ligne directrice afin de :

1. Corriger les critères de décision pour correspondre à ceux utilisés par rapport à ceux proposés dans les phases 3 et 4 de la validation ;
2. Corriger les informations figurant dans la ligne directrice pour ce protocole en ce qui concerne la caractérisation de la lignée cellulaire ;
3. Préciser que cette lignée cellulaire comprend une activité œstrogénique supplémentaire au-delà de l'ER.

- **Ligne directrice 458 « Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur des androgènes humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques »** (Pilote : Corée)

Deux propositions coréennes ont été soumises conduisant à une révision de la ligne directrice 458.

Essai basé sur le BRET pour la détection de l'homo-dimérisation du récepteur des androgènes par des produits chimiques en utilisant des cellules HEK-293 transfectées de manière stable

Afin d'améliorer la caractérisation des modalités de perturbation du récepteur des androgènes, la Corée propose de mettre à jour la ligne directrice afin d'inclure une approche basée sur le mécanisme BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) qui décrit le transfert d'énergie entre une molécule luminescente et une molécule photoréceptrice.

En effet, la perturbation de l'AR par des xénobiotiques peut entrer en compétition avec les androgènes endogènes pour se lier à un AR et à, à l'état actuel, la ligne directrice n'inclut pas de méthode validée pour caractériser le mode de fonctionnement des antagonistes des AR.

Dans ce contexte, la méthode BRET proposée par la Corée pourrait fournir des preuves scientifiques précieuses pour clarifier le mode d'action des androgènes exogènes antagonistes des AR dans le cadre d'une stratégie intégrée d'évaluation des risques des perturbateurs endocriniens médiés par l'AR.

Méthode simultanée d'essai pour la caractérisation de l'activité agoniste/antagoniste androgénique des produits chimiques et de leurs métabolites sur la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV_GR-KO

La Corée propose également une mise à jour de la ligne directrice afin d'intégrer un système de métabolisation (fraction S9) à l'essai de transactivation 22Rv1/MMTV_GR-KO.

En effet, les limites des méthodes d'essai de l'activité perturbatrice du système endocrinien basées sur des systèmes *in vitro*, telles que l'incapacité d'obtenir des informations sur l'activité des métabolites générés par l'exposition à ces produits chimiques dans l'organisme, sont continuellement évoquées. Pour surmonter cette limitation, la Corée propose l'adoption d'un système capable d'évaluer simultanément l'activité des substances chimiques d'origine et de leurs métabolites (phase I/phase I + II) en appliquant un extrait enzymatique dérivé du foie d'organismes vivants.

- **Ligne directrice 487 « Essai *in vitro* de micronoyaux sur cellules de mammifères »** (Pilotes : Royaume-Uni, Allemagne, France, Norvège, Etats-Unis, Luxembourg)

La version actuelle de la ligne directrice précise que pour les essais de nanomatériaux, il est nécessaire d'adapter le protocole. Toutefois, un projet antérieur sur cette thématique a abouti à la publication du document guide 359 (Study Report and Preliminary Guidance on the Adaptation of the *In Vitro* micronucleus assay (OECD TG 487) for Testing of Manufactured Nanomaterials, ENV/CBC/MONO(2022)15). Dans celui-ci, une série d'adaptations a été proposée. Cependant, ce travail présente encore des limites (par exemple, le faible nombre de matériaux testés, les nanomatériaux positifs de référence, le faible nombre de laboratoires impliqués).

Compte tenu de ces limites résiduelles, plusieurs pays dont la France proposent un effort concerté pour compléter les informations manquantes qui intègre aussi un essai inter-laboratoires utilisant le protocole déjà défini dans le document guide 359. Cet exercice d'inter-calibration permettra de mettre à jour le document guide, préalablement à la révision de la ligne directrice 487.

- **Ligne directrice 497 « Approches définies pour la sensibilisation cutanée »** (Pilotes : Suisse, Allemagne)

L'objectif est d'évaluer et d'inclure une approche définie (AD) dans la partie II de la ligne directrice 497 pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant de la peau. L'AD proposée conjointement par la Suisse et l'Allemagne est basée sur des modèles de régression quantitative qui s'appuient sur les données de l'ARDP cinétique (ARDPK, TG 442C) et sur les données générées avec les essais sur cellules décrits dans les lignes directrices 442D et 442E, et qui donnent un point de départ (PoD) pouvant être utilisé pour l'évaluation quantitative des risques. La partie II de la ligne directrice 497 est spécifiquement prévue pour prendre en compte de telles approches.

Les modèles de régression basés sur la TG 442D (KeratoSens) et les données cinétiques sur la réactivité des peptides ont été présentés en tant qu'étude de cas IATA dans le document guide 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 », ENV/JM/MONO(2016)29).

Cette approche a été améliorée en une approche définie et requalifiée sur la base des données du kDPRA (LD 442C), de la LD 442D (KeratoSens) et la LD 442E (h-CLAT). L'approche définie proposée ne repose donc que sur des données quantitatives provenant de tests utilisés pour l'identification des dangers conformément à la LD 497 et sur des données kDPRA générées pour la sous-classification GHS conformément à la LD 442C. L'approche définie soumise se propose donc d'utiliser de manière optimale les données générées conformément aux lignes directrices existantes.

- **Ligne directrice 498 « Phototoxicité *in vitro* - Essai sur épiderme humain reconstitué »** (Pilote : Corée)

Le modèle d'épiderme humain reconstitué (RhE), composé de cellules d'origine humaine, reproduit fidèlement les caractéristiques biochimiques et biologiques de l'épiderme humain. Il constitue ainsi une approche appropriée pour évaluer la cinétique de perméation cutanée des substances phototoxiques.

Cependant, à l'état actuel, un seul modèle RhE (EpiDerm™) est actuellement disponible dans la ligne directrice 498. De ce fait, les utilisateurs finaux de la ligne directrice en Asie sont souvent confrontés à des problèmes logistiques et à des coûts élevés. Il apparaît donc nécessaire d'établir des méthodes d'essai utilisant d'autres modèles. Pour répondre à cet objectif, la Corée a développé l'essai de phototoxicité KeraSkin™, qui a fait l'objet d'une étude de validation réalisée conformément au document guide 356 décrivant les standards de performance pour cette ligne directrice (Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *in Vitro* Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Testing of Topically Applied Substances, as described in Test Guideline 498, ENV/CBC/MONO(2022)12/REV1). Le projet a donc pour objectif d'intégrer le modèle KeraSkin™, comme méthode « me-too » dans la ligne directrice.

Le modèle KeraSkin™ RhE présente une structure multicouche composée par *stratum corneum*, granulaire, couche épineuse et basale. Sa microstructure morphologique et les expressions des biomarqueurs sont similaires à celles de l'épiderme humain.

- **Révision de la formulation des lignes directrices relatives aux essais de génotoxicité *in vivo* « Évaluation et interprétation des résultats » et « Rapport d'essai »** (Pilotes : Etats-Unis, Canada)

Selon les préconisations actuelles en termes d'interprétation de résultats de génotoxicité (document guide 238 « Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015 », ENV/JM/MONO(2016)33/REV1) trois éléments de preuve doivent être analysés :

- La réponse au produit chimique testé doit être évaluée pour déterminer s'il y a une augmentation statistiquement significative par rapport au contrôle négatif concomitant ;
- Deuxièmement, la réponse doit être liée à la concentration ou à la dose ;
- Enfin, un nouveau concept, qui utilise les distributions historiques du contrôle négatif, est introduit pour permettre d'évaluer la pertinence biologique.

Ces trois éléments sont censés avoir un poids « égal ». Toutefois, des analyses récentes suggèrent qu'il convient d'appliquer plus de nuances et de souplesse au troisième critère (c'est-à-dire la comparaison avec les témoins historiques). En effet, les distributions ne peuvent servir d'indicateur de la variation biologique normale que si elles sont d'une qualité suffisante à cette fin. À l'heure actuelle, il existe peu d'indications sur la manière d'évaluer leur qualité. Il s'agit d'un point important, car des distributions trop élargies, conséquence d'une mauvaise exécution de l'essai, peuvent avoir pour effet que des réponses par ailleurs positives soient interprétées comme équivoques, ce qui peut conduire à des tests supplémentaires.

Les révisions proposées par le binôme Etats-Unis/Canada aborderont ces questions en révisant la formulation de l'évaluation et de l'interprétation des résultats, en mettant à jour et en harmonisant leurs annexes, dans un premier temps pour les lignes directrices 470 et 488 puis ultérieurement pour les LD 474 et 489.

NOUVEAUX DOCUMENTS GUIDES

- **Approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation (IATA) pour l'immunotoxicité** (Pilote : Japon)

Un nouveau document guide relatif à l'immunotoxicité apparaît nécessaire pour établir un lien entre les AOPs, documents guides et lignes directrices publiées et en cours de développement (AOP, DG 360, LD 444A, projet de LD IL-2 Luc LTT, ...). Les tests *in chemico/in vitro/in vivo* répertoriés devraient contribuer à l'élaboration d'approches intégrées de test et d'évaluation (IATA) pour l'immunotoxicité, ainsi que plusieurs méthodes *in silico* disponibles et d'autres sources d'informations pertinentes pour les produits chimiques, les pesticides et les ingrédients cosmétiques.

Le document envisagé par le Japon vise à identifier les méthodes d'essai valides et d'autres sources d'informations pertinentes et à proposer la meilleure façon de les combiner pour la prédiction la plus précise du danger et/ou l'évaluation des risques des produits chimiques en matière d'immunotoxicité. Les forces et les limites de chaque méthode seront identifiées de manière standardisée dans un seul document intégré.

AUTRES TRAVAUX / DOCUMENTS

- **Etat de l'art sur l'application du séquençage de l'ADN de nouvelle génération avec correction d'erreur (ecNGS) pour l'évaluation des mutations génétiques** (Pilote : Etats-Unis)

L'objectif principal de ce projet soumis par les Etats-Unis est d'élaborer un état de l'art et une évaluation rétrospective de la performance prédictive pour les méthodes de séquençage de nouvelle génération avec correction d'erreur (ecNGS).

Le document décrira la performance prédictive de la méthode ecNGS pour l'évaluation des mutations génétiques en commençant, de façon rétrospective, par les résultats d'essais *in vivo* suivis par les résultats d'essais *in vitro*. Ce travail permettra de comprendre l'applicabilité de cette méthode pour améliorer les essais, fournir des informations mécanistiques supplémentaires et s'aligner aux principes des 3R.

- **Etat de l'art sur l'application d'organoïdes à la caractérisation de l'hépatotoxicité** (Pilote : Corée)

Les lignes directrices actuelles pour l'évaluation de la toxicité hépatique s'appuient sur les résultats d'essais sur animaux. Cependant, la pertinence de résultats obtenus grâce aux méthodes décrites par ces documents peut être compromise, notamment en raison des différences métaboliques. De plus, l'expérimentation animale, associée avec ces approches se heurte à des problématiques d'ordre éthique et économique.

Des chercheurs coréens ont développé une méthode d'évaluation de la toxicité basée sur des modèles d'organoïdes hépatiques. Cette méthode permet d'évaluer la toxicité à l'aide d'indicateurs toxicologiques spécifiques aux modèles d'organoïdes hépatiques, tels que la cytotoxicité. Pour soutenir cette recherche, le ministère coréen de la sécurité alimentaire et des médicaments a conduit des études de validation des méthodes d'évaluation de la toxicité utilisant les modèles d'organoïdes hépatiques.

En vue de l'élaboration d'une ligne directrice sur des modèles d'organoïdes hépatiques, la Corée propose en premier lieu, la rédaction d'une synthèse détaillée sur le sujet qui inclut des approches pour l'utilisation d'organoïdes hépatiques dans les stratégies d'évaluation de la toxicité du foie.

Le modèle d'organoïdes proposé par la Corée est un modèle 3D de cellules hépatiques obtenues à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines, qui présente une grande ressemblance avec l'histologie humaine. Ce modèle offre des avantages tels que la capacité de prolifération à grande échelle et de culture à long terme, ce qui facilite l'administration de doses répétées. Il permet également la mise en œuvre caractérisation de plusieurs indicateurs de toxicité hépatique.

Ces travaux se basent notamment sur l'article « A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction » paru dans le « Journal of Hepatology » (PMID : 36738840).

- **Etat de l'art sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites dans le cadre des lignes directrices** (Pilote : Secrétariat OCDE)

Les cellules souches pluripotentes induites (également appelées cellules iPS ou iPSC) sont un type de cellules souches qui peuvent être générées directement à partir de cellules adultes. La technologie iPSC est basée sur l'introduction de gènes spécifiques codant pour des facteurs de transcription qui peuvent convertir des cellules adultes en cellules souches pluripotentes.

Les systèmes à base de cellules souches sont déjà utilisés à des fins de développement de médicaments et de recherche, biomédicale en particulier.

Les iPSC sont également considérées comme des alternatives prometteuses pour les essais toxicologiques réglementaires et leur utilisation pour développer des systèmes potentiellement complexes (par exemple, des organoïdes) associés, par exemple, à l'analyse de la transcription des gènes ou d'autres éléments computationnels. Ces caractéristiques font des iPSC une technologie destinée à s'affirmer aussi dans un cadre réglementaire.

Pour ces raisons, le secrétariat de l'OCDE propose la rédaction d'une synthèse détaillée dont l'objectif sera d'examiner les pratiques actuelles en matière d'utilisation des iPSC, en tenant compte des promesses, des limites et des défis potentiels. Ce travail est identifié comme un projet commun entre l'ESCA et le WNT.

- **Développement d'un réseau d'AOP conduisant à la génotoxicité** (Pilote : Belgique, France)

L'objectif de cette proposition de la Belgique et de la France est d'intégrer les parcours d'effets néfastes (AOP) relatifs à la génotoxicité dans un réseau AOP afin de corroborer le développement de IATA pouvant intégrer différentes nouvelles approches (NAM) ne reposant pas sur l'utilisation d'animaux.

La génotoxicité, c'est-à-dire l'induction de dommages au matériel génétique, est un paramètre toxicologique essentiel qui conditionne l'évaluation de la sécurité des produits chimiques. Un produit chimique d'essai est classé comme génotoxique s'il a la capacité d'altérer la structure, le contenu informatif ou la ségrégation de l'ADN, en interférant avec les processus de réplication normaux ou en altérant la réplication d'une manière non physiologique.

Afin de permettre une évaluation complète du potentiel génotoxique d'un produit chimique testé, trois paramètres génotoxiques différents doivent être pris en compte, à savoir l'induction de mutations génétiques, ainsi que les aberrations chromosomiques structurelles (clastogénicité) et numériques (aneugénicité). Pour couvrir correctement les trois effets génotoxiques, une batterie de tests de génotoxicité multiples *in vitro* et/ou *in vivo* est nécessaire.

Dans différents cadres réglementaires, les tests de génotoxicité commencent par une batterie de tests *in vitro* couvrant les mutations génétiques des cellules bactériennes et/ou mammaliennes et les aberrations chromosomiques structurelles et numériques, suivis de tests *in vivo* en cas de résultat positif. Toutefois, cette stratégie présente plusieurs limites, notamment (i) le nombre élevé de faux résultats positifs *in vitro* déclenchant des tests inutiles sur les animaux, (ii) les informations mécanistiques limitées, (iii) le manque d'analyse quantitative des données de génotoxicité collectées et (iv) l'intégration insuffisante des NAM.

Pour remédier à ces problèmes le projet propose de poser les bases pour le développement d'une IATA.

Afin de s'assurer un alignement entre le travail effectué dans le cadre de ce projet et les autres activités en cours dans ce domaine, les résultats des différentes tâches seront partagés et discutés avec l'ESCA et le WNT.

→ Points d'actualité

Début des travaux de révision du « Guidance Document 34 on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment »

Le document d'orientation GD 34 a été publié en 2005, et il est largement reconnu que les procédures utilisées dans le passé pour la validation et l'acceptabilité internationale des méthodes doivent être révisés afin de les rendre plus efficaces.

Une proposition pour la révision de ce document, porté par l'Union Européenne, les USA et les Pays-Bas a été déposée dans ce but en novembre 2022 et les besoins de révision ont été abordés lors d'un workshop intitulé « How to prepare for emerging technologies ? » qui s'est tenu les 1-2 décembre 2022 dans le contexte du WNT.

Les principaux points identifiés étaient :

- i) Critères de maturité de la méthode d'essai ;
- ii) Faire évoluer le concept de standard de performance ;
- iii) Acceptabilité des méthodes mécanistiques ;
- iv) Validation des batteries d'essais.

Sur cette base, après intégration du projet de révision dans le programme de travail des lignes directrices, une première réunion du groupe d'experts s'est tenue le 5 décembre 2023. Le périmètre du document notamment pour les types de méthodes devant être inclus dans le GD34 (*in vivo*, *in vitro*, *in silico*) ainsi que la prise en compte des nouvelles approches méthodologiques (tests batteries, organoïdes, IATA, AOPs...) ont été discutés lors de cette réunion. La place, la validation et la nécessité de définir clairement les limites/incertitudes des modèles et notamment des nouvelles méthodologies ont été abordés. Le besoin de rendre les procédures de validation plus efficaces a été souligné. Une attention a également été portée à bien répondre aux besoins des publics visés qui peuvent être les développeurs de méthodes ou des instances réglementaires.

Une prochaine réunion en présentiel est prévue en avril 2024 pour poursuivre ces actions.

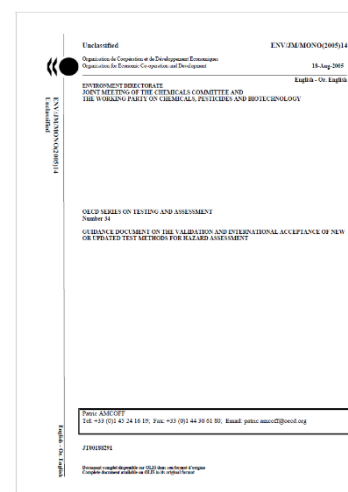
Méthode alternative pour la caractérisation des potentiels génotoxique et cancérigène des produits chimiques

Le Dr Marc Audebert nous propose un focus sur la méthode développée par l'UMR1331 ToxAlim INRAE pouvant caractériser les potentiels génotoxique et cancérigène des substances chimiques. Un projet de rédaction d'un article de revue détaillé sur cette méthode est actuellement inscrit au programme sur les lignes directrices.

Afin de déterminer le potentiel cancérigène des composés chimiques, le seul test réglementaire existant est réalisé sur des rongeurs. Du fait des différences physiologiques inter-espèces (métabolisme, réparation de l'ADN...), la validité des tests sur les animaux pour prédire des effets cancérigènes chez l'Homme est remise en question.

Plus de 90 % des molécules cancérigènes sont génotoxiques et des tests de mesure de la génotoxicité *in vitro* ont été développés (Ames, micronoyaux) comme alternatives au test de cancérogénèse. Ces tests sont réglementaires mais ne sont pas suffisamment fiables et conduisent à des résultats difficilement extrapolables à l'Homme. De plus, il est maintenant demandé de manière réglementaire pour les tests de génotoxicité d'avoir des indications sur le mode d'action génotoxique des produits testés : aneugène (anomalie du nombre de chromosome) ou clastogène (cassure de l'ADN).

Au sein de l'UMR1331 ToxAlim INRAE, un nouveau test de génotoxicité avec des cellules humaines basé sur la quantification de deux biomarqueurs complémentaires a été mis au point et validé. La phosphorylation de l'histone H2AX (nommée alors γ H2AX), indique les dommages à l'ADN et donc globalement la génotoxicité des composés clastogènes. La phosphorylation de l'histone H3 (nommée alors pH3) permet de caractériser les cellules bloquer en mitose, caractéristique de l'effet des composés aneugènes. L'utilisation de ce test nommé γ H2AX/pH3 a permis de



démontrer le potentiel génotoxique de plus de 700 composés. L'évaluation de la méthode γ H2AX/pH3 a démontré une prédictivité largement supérieure aux tests traditionnels, de l'ordre de 95 %. De plus c'est le seul test qui permet de différencier efficacement les composés aneugènes des composés clastogènes.

La méthode γ H2AX/pH3 est recommandée par différentes agences d'évaluation (SCCS, EFSA, ANSES, ECHA, FAO), notamment dans la section sur le poids de la preuve (WoE). Les travaux, actuellement en cours, à l'OCDE sont censés ouvrir la voie à une acceptabilité globale pouvant permettre au test γ H2AX/pH3 d'être utilisé au même titre que le test d'Ames ou du micronoyaux dans des dossiers réglementaires.

Bibliographie

- Kopp, B., Khoury, L., and Audebert, M. (2019) Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. Archives of Toxicology 93(8):2103-2114.
- Khoury, L., Zalko, D. and Audebert, M. (2016) Complementarity of phosphorylated histones H2AX and H3 quantification and different cell lines for genotoxic screening. Archives of Toxicology 90(8):1983-95.
- Khoury, L., Zalko, D. and Audebert, M. (2016) Evaluation of four human cell lines with distinct biotransformation properties for genotoxic screening. Mutagenesis, 31(1):83-96.
- Khoury, L., Zalko, D., and Audebert, M. (2013). Validation of high-throughput genotoxicity assay screening using gammaH2AX in-cell western assay on HepG2 cells. Environ Mol Mutagen 54, 737-746.

→ Consultations publiques en cours

Les documents ci-dessous sont actuellement soumis à consultations publiques :

- Draft new Test Guideline for the Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using Daphnia magna (JHASA) et rapport de validation associé, jusqu'au 22 décembre 2023, <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section-2-effects-biotic-systems.htm>.
- Draft new Test Guideline for the Rapid Estrogen ACTivity In Vivo assay (REACTIV) et rapport de validation associé, jusqu'au 22 décembre 2023, <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section-2-effects-biotic-systems.htm>.
- Draft revised Guidance Document no 75 on the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Brood Test under Semi-Field Conditions, jusqu'au 24 janvier 2024, <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/draft-guidance-review-documents-monographs.htm>.
- Draft Updated TG 467 Part III: Defined Approach on Eye Irritation for Solids, jusqu'au 22 décembre 2023, <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects.htm>.

→ Personnes-contacts

Vos interlocuteurs sont toujours les suivants :

- Activités en lien avec l'évaluation des effets sur la santé (section 4) :
Enrico MOMBELLI (enrico.mombelli@ineris.fr, 03 44 61 81 44),
- Activités en lien avec les autres domaines (section 1 : propriétés physico-chimiques ; section 2 : Effets sur les systèmes biologiques ; section 3 : Dégradation et accumulation ; section 5 : Autres lignes directrices) :
Pascal PANDARD (pascal.pandard@ineris.fr, 03 44 55 67 19).