

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



DECEMBRE 2021

Ineris - 204137 - 2728543 - v.1.0

Actualités

La phase de soumission des nouveaux sujets en vue de leur intégration dans le programme de travail des lignes directrices de l'OCDE vient de s'achever. Ces propositions ont été communiquées aux Coordinateurs Nationaux des différents Pays Membres afin que ceux-ci se positionnent sur la pertinence de développer ces thématiques et de définir leurs niveaux d'implication respectifs.

Si l'année dernière avait été caractérisée par un nombre de propositions restreint, le nombre pour 2022 apparaît conforme à celui des années antérieures. Ces sujets, présentés ci-après par catégories de documents et/ou d'actions, sont au nombre de 20, les propositions relatives à la section 4 – Effets sur la santé restant toujours majoritaires. Les retours relatifs à ces propositions doivent être transmis au secrétariat du programme des lignes directrices de l'OCDE pour le 17 janvier 2022. Les proposant auront ensuite jusqu'à la fin du mois de février 2022 pour répondre aux commentaires et modifier les propositions (si nécessaire) en collaboration avec les Coordinateurs Nationaux des pays concernés.

Il convient de mentionner la contribution nationale importante dans ces propositions, en pilote unique ou en pilotage partagé avec d'autres Pays Membres à la fois dans la section 2 – Effets sur les systèmes biologiques et la section 4 – Effets sur la santé, avec les premières soumissions des projets développés dans le cadre de la plateforme de pré-validation PEPPER.

→ Nouveaux sujets 2022

NOUVELLES LIGNES DIRECTRICES

▪ Sediment-Water Amphipod Toxicity Test Using Spiked Sediment

L'objectif de ce projet est d'établir une nouvelle ligne directrice permettant d'évaluer la toxicité sub-chronique et chronique des substances chimiques (principalement hydrophobes, persistantes et à forte capacité d'adsorption) vis-à-vis de *Hyalella azteca* ou d'autres espèces d'amphipodes d'eau douce. Ces espèces ont des modes d'habitat et d'alimentation différents des espèces faisant déjà l'objet de lignes directrices adoptées (*Chironomus sp.*, *Lumbriculus variegatus*, *Myriophyllum spicatum*). Il est proposé de structurer le projet de ligne directrice en deux parties : partie 1, un essai de toxicité subchronique de 10 jours et une partie 2, un essai chronique de 42 jours couvrant les effets sur la reproduction. Des protocoles d'essais de toxicité subchronique et chronique utilisant *H. azteca* ont déjà été élaborés par plusieurs organisations (ASTM, Environnement et Changement climatique Canada, ISO et USEPA). Cependant, les modalités peuvent varier, en ce qui concerne l'âge des organismes d'essai, la fréquence de renouvellement de la colonne d'eau et les périodes d'exposition, notamment. Les travaux d'harmonisation des protocoles vont permettre de sélectionner les conditions expérimentales les plus pertinentes de façon à améliorer la comparabilité des données de d'écotoxicité obtenues (pilote : Japon, France).

- **Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA): An *In Vitro* Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals**

L'objectif de ce projet est d'établir une nouvelle ligne directrice pour une méthode *in vitro* permettant d'identifier le potentiel de sensibilisation cutanée des substances chimiques. Il s'agit de réduire l'utilisation d'animaux grâce à un remplacement des lignes directrices *in vivo* par des tests alternatifs. Le test de sensibilisation épidermique (EpiSensA) est un test basé sur l'épiderme humain reconstitué qui mesure l'expression de quatre gènes liés aux réponses critiques des kératinocytes lors de l'induction d'une sensibilisation cutanée. La méthode proposée est caractérisée par un large domaine d'application et elle discrimine les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants avec une précision de 82,4% et 78,8%, par rapport aux données LLNA et humaines. Cette performance prédictive a été estimée en utilisant 136 produits chimiques, y compris des produits chimiques lipophiles et des pré/pro-haptènes qui peuvent donner lieu à des faux négatifs lors de l'application des tests *in vitro* existants (pilote : Japon).

- **Use of an interleukin-2 luciferase lymphotoxicity test for identifying the immunotoxic potential of chemicals that is caused by anti-proliferative effects**

Le test de l'interleukine-2 luciférase (IL-2 Luc), qui a déjà été approuvé en 2020 dans le cadre du programme de travail des lignes directrices, a été spécifiquement développé pour la détection de l'immunotoxicité des produits chimiques, faisant intervenir l'IL-2. Dans le contexte de ce projet, le test IL-2 Luc a été modifié en un test de lymphotoxicité à l'IL-2 luciférase (IL-2 Luc LTT) pour détecter les effets antimitotiques des médicaments immunosuppresseurs. La vocation de ce test est de devenir une composante d'une approche intégrée de test et d'évaluation (IATA) pour la détection du potentiel immunotoxique des substances chimiques *in vitro* (pilote : Japon).

- **Stably transfected human glucocorticoid receptor hGR transcriptional activation assay for detection of agonistic and antagonist activity of chemicals towards hGR**

Ce projet se propose de développer une nouvelle ligne directrice pour la détection d'effets antagonistes et agonistes pour le récepteur des glucocorticoïdes (GR). Le GR est un facteur de transcription activé par un ligand de la famille des récepteurs aux stéroïdes et de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il est impliqué dans un large éventail de processus physiologiques clés, notamment la réponse au stress, le système immunitaire et le métabolisme.

Son expression est ubiquitaire et ses ligands comprennent les glucocorticoïdes (GC) endogènes et synthétiques tels que le cortisol, la dexaméthasone et la prednisolone. Une fois activé par un ligand, le GR est capable de moduler la transcription de gènes cibles.

En raison de l'implication du GR dans des processus physiologiques clés, il est important d'évaluer la capacité des produits chimiques à interférer avec ce récepteur nucléaire spécifique mais, à l'état actuel, il n'existe pas de ligne directrice pour la caractérisation d'une perturbation du GR. Pour caractériser ces interférences avec le GR, ce projet propose l'utilisation d'une lignée cellulaire transfectée de façon stable, HMLN-hGR, exprimant le gène rapporteur luciférase spécifiquement activé par le GR en présence d'un ligand. Cette lignée cellulaire peut être utilisée dans un test de transactivation *in vitro* pour l'évaluation de l'activité agoniste et antagoniste des produits chimiques vis-à-vis du GR humain (pilote : France, Canada).

- **Development of a Test Guideline based on the hPlacentox method for endocrine disruptors effect assessment on human placental model**

Lors d'une grossesse les effets des xénobiotiques peuvent impacter non seulement la santé de la mère mais aussi celle du fœtus. Les effets sur ce dernier peuvent être immédiats, ayant un impact direct sur son développement, ou retardés.

Le placenta est un organe spécifique de la grossesse, très différent chez l'homme par rapport aux autres mammifères. Il s'agit non seulement d'une barrière mais aussi d'un organe concentrant les xénobiotiques, y compris les perturbateurs endocriniens. L'altération du placenta entraîne des effets néfastes sur le développement du fœtus, ainsi que sur la santé de la mère et de l'enfant à naître. Le placenta contrôle la sécrétion d'hormones stéroïdiennes et peptidiques. Au niveau cellulaire, le récepteur P2X7, connu pour son implication dans les maladies dégénératives, semble jouer un rôle clé dans la perturbation du placenta.

L'objectif de ce projet est de proposer une méthode *in vitro* basée sur un modèle de placenta humain, capable de détecter les xénobiotiques qui altèrent l'activation du récepteur P2X7 et/ou la sécrétion hormonale. L'approbation d'une nouvelle ligne directrice basée sur cette méthode comblerait une lacune informationnelle concernant l'évaluation des effets des xénobiotiques lors d'une grossesse (pilote : France).

RÉVISION DE LIGNES DIRECTRICES EXISTANTES

▪ **Sediment–water Chironomus test using spiked-sediment or spiked-water (TG 218 and TG 219)**

Les versions actuelles des lignes directrices 218 (Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé) et 219 (Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment) contiennent quelques imprécisions et incohérences dont certaines d'entre elles ont déjà été soulevées dans le cadre des évaluations de l'EFSA. Les principaux objectifs de cette proposition sont donc de réviser ces deux lignes directrices en se focalisant sur les points suivants :

- l'exigence de mesures analytiques plutôt que de simples recommandations,
- l'analyse de la phase sédimentaire,
- l'évaluation d'endpoints complémentaires ainsi que leur mode de calcul et d'expression,
- l'ajout d'un bilan massique,
- la prise en compte d'un protocole par dopage de la nourriture et période de stabilisation avant le début de l'exposition (pour la TG 218),
- la révision des analyses statistiques (puissance, type de régression),
- la clarification de l'introduction.

(pilotes : Allemagne, Suisse).

▪ **Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) (TG 240)**

L'objectif principal de la révision est de mettre à jour la section relative à l'analyse statistique (Annexe 10) de la version actuelle de la ligne directrice, de façon à être en adéquation avec l'actualisation de la ligne directrice 890.2200 de l'USEPA OCSPP. De plus, il est également proposé de compléter le texte afin de clarifier le protocole et les critères d'évaluation clés (par exemple, heure de la première ponte, œuf fertiles) et d'ajouter des informations sur les souches qui ont satisfait aux critères de validité (pilote : Japon, Etats-Unis).

▪ **H295R Steroidogenesis Assay (TG 456)**

- **Proposal for TG 456 Data Interpretation Procedure clarifications to improve accuracy and relevance of the positive and negative calls**

Ce projet propose de réviser la procédure d'interprétation des données générées avec la ligne directrice 456. En effet, certains organismes de recherche contractuelle et d'autres laboratoires appliquant cette ligne directrice ont signalé un nombre anormalement élevé de faux positifs. Une analyse critique de la procédure d'interprétation des données a mis en évidence son hypersensibilité et son manque de précision. Cette caractéristique de la ligne directrice peut aussi conduire à des demandes d'études complémentaires *in vivo* inutiles. Ce problème est dû à l'application d'un critère de significativité statistique qui fait abstraction de l'ampleur du changement du niveau de synthèse hormonale par rapport aux témoins négatifs. Pour améliorer cette ligne directrice, ce projet propose d'appliquer un test statistique seulement si la perturbation de la synthèse hormonale est caractérisée par un changement égal ou majeur à un facteur 1,5 (pilote : Royaume-Uni, OCDE).

- **LCMS/MS based steroidogenesis profiling-enhancement of TG 456**

L'objectif de cette proposition est d'augmenter (jusqu'à 19) le nombre d'hormones/précurseurs mesurés. Le choix du type de mesure LCMS/MS est lié au nombre élevé de paramètres à mesurer qui rendrait impossible l'application de la méthode immuno-enzymatique ELISA, ainsi qu'au fait que ce type d'équipement est disponible dans de nombreux laboratoires.

L'augmentation proposée du nombre de paramètres mesurés dans la TG 456, au-delà de l'estradiol et de la testostérone, maximiserait l'utilité réglementaire de cette ligne directrice en donnant plus d'informations sur la perturbation de la stéroïdogénèse. L'augmentation du nombre de paramètres mesurés nécessitera d'étendre/modifier la procédure d'interprétation des données et la méthode de prédiction de la ligne directrice actuelle. Ce projet établira une connexion avec l'initiative britannique portant sur la même ligne directrice (pilote : France).

▪ **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay (TG 489)**

Ce projet a pour objectif principal de modifier la ligne directrice 489 (Test des comètes *in vivo* en conditions alcalines sur Cellules de Mammifères) pour faciliter la collecte de données de génotoxicité spécifiques aux cellules germinales mâles. Dans sa version actuelle, la ligne directrice 489 n'est pas validée pour l'analyse des dommages à l'ADN dans les cellules germinales matures en raison des niveaux de base variables et des modalités d'exposition. En outre, la

TG 489 indique au paragraphe 10 que « les résultats positifs dans l'ensemble de la gonade (testicule) ne reflètent pas nécessairement des dommages aux cellules germinales ; néanmoins, ils indiquent que le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) et/ou ses métabolites ont atteint la gonade ».

À l'heure actuelle, il existe quelques méthodes pour les études de mutagénicité sur les cellules germinales, mais elles sont souvent plus coûteuses, sont consommatrices de temps et/ou nécessitent de nombreux animaux, ce qui limite considérablement leur utilisation. En revanche, le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines chez les mammifères est relativement bon marché, facile à réaliser, ne nécessite pas une grande quantité d'animaux et a une sensibilité élevée. La révision de la ligne directrice pour obtenir des résultats sur des groupes sélectionnés de cellules germinales (spermatocytes primaires et spermatides rondes) permettra la collecte de données de génotoxicité spécifiques aux cellules germinales et améliorera l'harmonisation internationale de l'évaluation et de la classification des dangers concernant les mutagènes des cellules germinales (pilotes : Norvège, Danemark).

- ***In vitro* Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (TG 496)**

L'objectif de ce projet est d'ajouter la méthode d'essai d'irritation oculaire OptiSafe™ dans la ligne directrice de l'OCDE 496. Cet ajout offrirait la possibilité de mettre en place un test d'irritation oculaire précis, à haute sensibilité et alternatif à l'expérimentation animale. OptiSafe™ est une méthode *in vitro* qui se base sur l'application d'une substance d'essai sur une membrane semi-perméable et sur une caractérisation des altérations causées aux macromolécules la composant. Cette caractérisation permet ensuite d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire des substances chimiques.

Des études de validation ont démontré qu'OptiSafe™ présente un taux de faux négatifs de 0 % et une précision de 79 à 80 %. Dans un examen comparatif, la précision et la sensibilité d'OptiSafe™ se sont révélées meilleures que les méthodes alternatives actuelles pour la caractérisation de l'irritation oculaire acceptées par l'OCDE (pilote : Etats-Unis).

- **Defined Approaches on Skin Sensitisation (TG 497)**

L'objectif de ce projet est d'appliquer le cadre d'évaluation de la ligne directrice 497 sur les approches définies (AD) pour la sensibilisation cutanée aux mêmes AD (203, ITS), mais en fonction d'autres sources d'information. Ces sources d'information "me-too" concernent les essais *in chemico* et *in vitro* basés sur l'analyse des événements clés pour la sensibilisation cutanée (TG 442C, 442D et 442E) ou de modèles *in silico* qui démontrent une performance et une fiabilité équivalentes à celles détaillées dans la version actuelle de la ligne directrice. L'utilisation des sources d'information "me-too" dans les AD dépendra de la disponibilité des données et de la capacité d'adapter la procédure d'interprétation établie pour la ligne directrice 497 à ces nouvelles sources d'information (pilote : Etats-Unis). A noter, une demande forte des Etats-Unis envers les autres Pays Membres pour partager l'animation de ces travaux.

NOUVEAUX DOCUMENTS GUIDES

- **Guidance document on integrated *in vitro* approach for intestinal fate of orally ingested nanomaterials**

L'enjeu de ce projet est de développer un nouveau document guide proposant une approche *in vitro* pour la caractérisation du devenir des nanomatériaux une fois ingérés. En effet, à ce jour, ce sujet n'est pas couvert par aucun document OCDE. De façon plus précise, ce projet est axé autour de la reproduction *in vitro* des étapes du processus de digestion, c'est-à-dire le comportement des nanomatériaux dans les différents compartiments digestifs (bouche, estomac, intestin). Le projet propose d'identifier sur la base d'une analyse de la littérature et de données issues d'autres projets, les meilleures techniques analytiques pour la détection des nanomatériaux dans les matrices biologiques et de comprendre comment considérer ces données lors d'une caractérisation des dangers liés aux nanomatériaux. La robustesse et la reproductibilité des protocoles proposés seront également évaluées par des tests inter-laboratoires ad hoc. (pilote : Italie).

RÉVISION DE DOCUMENTS GUIDES EXISTANTS

- **Guidance Document on the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Brood Test Under Semi-field Conditions (GD 75)**

Le GD 75 fournit une base pour la mise en place d'essais en conditions de « semi-terrain » afin d'évaluer les effets néfastes des pesticides et autres produits chimiques sur le couvain d'abeilles, les colonies d'abeilles mellifères et la performance globale de la colonie. Depuis son adoption, les essais réalisés et leurs évaluations ont conduit à plusieurs adaptations du dispositif expérimental permettant d'améliorer la reproductibilité du test, de limiter la variabilité entre

les répétitions et les études et également d'améliorer l'évaluation des paramètres de mesure liés à la performance globale des colonies d'essai. Le projet a pour donc objectif de proposer une version révisée du document guide intégrant ces améliorations (pilotes : Allemagne, Suisse).

▪ **Guidance Document on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials (GD 317)**

Ce projet vise à réviser le document guide 317 sur les essais d'écotoxicité aquatique et du sédiment appliqués aux nanomatériaux afin d'inclure des annexes détaillées fournissant des recommandations techniques pour la conduite des essais les plus couramment utilisés dans un cadre réglementaire ; TG 201 (Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance), TG 202 (*Daphnia sp.*, essai d'immobilisation immédiate) et TG 203 (Poisson, essai de toxicité aiguë). L'objectif est de compléter les recommandations générales déjà présentes dans le document guide de façon à générer des résultats robustes et reproductibles. Les questions relatives à l'influence des modes opératoires de préparation des suspensions d'essai, la caractérisation des MN dans les milieux d'essai, les systèmes d'exposition ou la mise en œuvre d'un essai limite sont des préoccupations communes à ces trois lignes directrices. En complément, les limitations spécifiques à chacune des lignes directrices (par exemple les MN qui peuvent potentiellement interférer avec les méthodes de quantification de la biomasse algale) seront également détaillées dans ces annexes (pilotes : Espagne, France).

AUTRES TRAVAUX / DOCUMENTS

▪ **Detailed review paper on methods and feasibility assessment to enable inclusion of mammary gland whole mount collection and evaluations**

L'incidence du développement précoce des seins, du cancer du sein préménopausique et de la lactation insuffisante ou écourtée a augmenté dans le monde entier au cours des deux dernières décennies. Ces problèmes de santé ont été associés à des expositions chimiques, à l'ethnicité et à des disparités en matière de santé environnementale, et méritent donc une attention prioritaire.

Une initiative danoise propose la rédaction d'un état de l'art (detailed review paper) sur les méthodes d'examen de la totalité des tissus de la glande mammaire (« mammary gland whole mount », MGWM) afin de caractériser son potentiel diagnostique pour la détection d'effets néoplasiques organisationnels et microscopiques persistants. Ce travail s'inscrit dans une optique de révision ultérieure de la ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération) afin d'inclure la MGWM chez les rats femelles venant d'être sevrées (pilote : Danemark).

▪ **Support of the review of data supporting the use of the LLNA BrdU ELISA method for UN GHS classification for skin sensitization**

En décembre 2020, le Japon a proposé au sous-comité d'experts du GHS de l'ONU la mise à jour des critères de sous-catégorisation sur la base de l'essai LLNA BrdU-ELISA, OCDE TG442B. Ce comité a demandé que le groupe d'experts de l'OCDE entreprenne une révision des données qui argumentent la proposition du Japon. L'objectif de ce travail de support est d'examiner le contexte scientifique et la justification de la mise à jour proposée par le Japon et de parvenir à une conclusion sur l'adéquation des données LLNA BrdU-ELISA pour sous-catégoriser les sensibilisants cutanés (pilote : Japon, OCDE).

▪ **Support the work on the criteria for classification for germ cell mutagenicity**

Lors de la 39^{ème} session du sous-comité GHS de l'ONU, l'Union Européenne a proposé de créer un groupe de travail informel afin de pouvoir clarifier les critères de classification de la mutagénicité sur les cellules germinales dans la catégorie 1B et, plus en général, de procéder à une mise à jour du chapitre 3.5 du GHS de l'ONU sur la mutagénicité des cellules germinales. Les travaux du groupe de travail informel sont organisés par le JRC de la Commission Européenne. La tâche initiale du groupe de travail informel était d'établir un programme de travail, qui a été étendu à la révision des critères pour toutes les catégories, y compris la catégorie 1A et la catégorie 2. Le rôle de l'OCDE dans ce contexte sera de mettre en place un groupe d'experts afin de conduire une analyse critique des critères de classification (pilote : JRC, OCDE).

▪ **Feasibility Study on Inclusion of the Skin Allergy Risk Assessment (SARA) Model into OECD Guideline 497 on Defined Approaches for Skin Sensitisation**

L'objectif de ce projet est d'étudier la faisabilité de l'ajout d'une autre approche définie pour la sensibilisation cutanée à la ligne directrice 497. Cette approche définie supplémentaire est le modèle *in silico* d'évaluation du risque d'allergie cutanée (SARA) capable d'élaborer (approche statistique bayésienne) un résultat quantitatif pour le potentiel sensibilisant permettant d'établir un point de départ pour l'évaluation quantitative des risques. Cette approche computationnelle s'appuie sur des données historiques humaines (HRIPT) et murines (LLNA) mais, elle permet aussi la prédiction à partir de données *in vitro* : le test de réactivité peptidique directe (DPRA ; TG 442C), le test KeratinoSens™ (TG 442D), le test h-CLAT (TG 442E) ou le test U-SENS™ (TG 442E) (pilote : Etats-Unis).

▪ **Eye hazard identification: Defined Approach for Surfactants**

L'objectif de cette proposition est de développer une nouvelle approche définie pour l'irritation oculaire pour les produits chimiques ayant des propriétés tensioactives. Ce projet suit la même logique que celle du projet 4.136 de l'OCDE sur les approches définies pour la caractérisation des dangers oculaires des liquides. Dans le cadre de ce projet, Cosmetics Europe a mis au point une approche définie couvrant les trois catégories du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (GHS) des Nations unies : la catégorie 1 (Cat. 1) pour les "lésions oculaires graves", la catégorie 2 (Cat. 2) pour l'"irritation oculaire" et l'absence de catégorisation (No Cat.) pour les substances "ne nécessitant pas de classification ni d'étiquetage" pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves. L'approche définie est basée sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes d'essai décrites dans les lignes directrices de l'OCDE 491 et 492. L'approche définie est élaborée sur la base d'une analyse statistique approfondie d'une base de données de tensioactifs associés avec des données d'essais *in vitro* et avec des données *in vivo* (test de Draize) (pilote : France).

→ Personnes-contacts

Comme pour les années précédentes, si vous souhaitez vous positionner sur ces propositions, vos interlocuteurs sont 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).