

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



Ineris - 206992 - 2745709 - v.1.0

JUILLET 2022

Éditorial

Cette nouvelle édition de la lettre d'information reprend les éléments marquants du programme des lignes directrices de l'OCDE pour ce premier semestre. Elle présente les principales décisions prises lors de la réunion annuelle des Coordinateurs Nationaux (WNT 34, 26 - 29 avril), notamment la sélection des nouveaux sujets en vue de leur intégration dans le programme de travail et l'adoption des différents documents (lignes directrices nouvelles ou révisées, documents guides...). A l'inverse des deux années précédentes, cette 34^{ème} réunion s'est tenue sous un format hybride.

Toutes les lignes directrices (nouvelles et révisées) détaillées dans les paragraphes suivants ont été publiées par l'OCDE le 30 juin 2022¹.

→ Publication des nouveaux documents

NOUVELLES LIGNES DIRECTRICES

LD 124 : Détermination de la surface spécifique en volume des nanomatériaux manufacturés

Cette ligne directrice décrit une procédure permettant de déterminer la surface volumique spécifique (VSSA) des nanomatériaux manufacturés solides sous forme de poudre. Cette propriété physico-chimique peut influencer le comportement et les effets biologiques des nanomatériaux manufacturés et peut donc être demandée pour les essais de sécurité des nanomatériaux manufacturés. Les données de VSSA ou sur la surface spécifique (SSA) peuvent fournir des informations sur la structure caractéristique du nanomatériau et aider : a) à identifier les dangers potentiels ou les modifications des dangers associés à des structures similaires, b) à estimer le devenir des nanomatériaux dans l'environnement et c) aider à identifier les modifications liées aux propriétés physico-chimiques les dangers spécifiques à certains sites d'exposition. De plus, dans certains cas, les données VSSA ou SSA peuvent être utilisées pour relier la dose au devenir, au comportement et aux effets observés d'un nanomatériau spécifique, car la surface peut représenter une mesure de dose toxicologiquement pertinente.

Cette ligne directrice est basée sur l'adsorption de gaz par la méthode Brunauer – Emmett - Teller (BET) et la pycnométrie gazeuse. Pour soutenir le développement de cette ligne directrice, le JRC a organisé une comparaison inter laboratoires dont les résultats ont été publiés en juin 2021.

¹ <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>

LD 125 : Taille des particules et distribution granulométrique des nanomatériaux

Cette ligne directrice décrit différentes méthodes permettant de déterminer la taille et les distributions de taille des particules et des fibres à l'échelle nanométrique. Elle couvre la gamme de taille de 1 nm à 1000 nm et est divisée en deux parties : la description des méthodes pour les particules et les méthodes pour les fibres. Elle complète la ligne directrice 110 (adoptée en 1981) sur la « Distribution granulométrique/Distributions de longueur et de diamètre des fibres » et se superpose à celle-ci dans la gamme de taille de 250 nm à 1000 nm. Dans la continuité de la LD 110, cette nouvelle ligne directrice pour les nanomatériaux comprend des parties distinctes pour les particules et les fibres. Pour la partie de la ligne directrice traitant des particules, différentes méthodes sont intégrées : AFM, CLS/AUC, DLS, DMAS, PTA/NTA, SAXS, SEM and TEM. La méthode sp-ICP-MS n'a pas pu être suffisamment validée dans le cadre de l'essai inter laboratoires. Son applicabilité est essentiellement limitée aux nanomatériaux avec des valeurs de masse élevées en combinaison avec une taille de particules suffisamment élevée. Le détail de la méthode et les limites associées sont présentés en annexe.

LD 251 : Essai de détection rapide d'un rapporteur de l'activité de perturbation androgénique (RADAR)

Cette ligne directrice décrit un essai utilisant des éléuthéro-embryons transgéniques de medaka (*Oryzias latipes*) pour détecter les substances chimiques qui interfèrent avec l'axe des androgènes. Le test RADAR a été conçu comme un outil de dépistage permettant de classer les substances chimiques en potentiellement actives ou inactives sur l'axe des androgènes. Cet essai est placé au niveau 3 du cadre conceptuel de l'OCDE concernant les lignes directrices relatives à la mesure des effets des perturbateurs endocriniens.

Le test mesure la capacité d'une substance chimique à activer ou à inhiber la transcription de la construction génétique spg1-gfp, que ce soit directement en se liant au récepteur des androgènes (AR) ou en modifiant la liaison des androgènes à l'AR, ou indirectement en modifiant la quantité d'androgènes disponibles pour activer l'AR et ainsi la transcription de la construction spg1-gfp. Cette ligne directrice a fait l'objet d'un essai circulaire sur 8 substances (en complément de la substance de référence) ayant impliqué 5 laboratoires.

En complément des quelques précisions et modifications éditoriales, le seul point technique ayant été discuté au cours de la réunion a concerné le nombre de concentrations à considérer au cours de l'essai. Il est actuellement de 3 ; il a été demandé de tester 5 concentrations pour appréhender la relation effet/concentrations. Il s'agit d'un sujet récurrent pour lequel les positions peuvent changer en fonction des lignes directrices. Il est proposé de traiter le sujet de façon harmonisée au niveau de VMG-Eco.

LD 320 : Transformation anaérobie dans le lisier

Cette ligne directrice a pour objectif d'évaluer la transformation des produits chimiques (principalement biocides et médicaments vétérinaires) dans les lisiers (porcs et bovins) en conditions anaérobies. Le protocole proposé permet de déterminer le taux de transformation, l'identité et les taux de formation et de diminution des produits de transformation, la quantité de produit chimique initial qui est minéralisée en CO₂ ou CH₄, ou qui est transformée en produits de transformation volatils, et la quantité de résidus non extractibles. Ce type d'études s'avère pertinent pour les produits chimiques qui sont administrés aux animaux hébergés et qui sont ensuite excrétés (par exemple, les médicaments vétérinaires ou les additifs alimentaires) ou pour les produits chimiques qui sont appliqués dans les bâtiments d'élevage et peuvent également pénétrer dans le lisier collecté dans ces bâtiments (par exemple, les biocides).

La robustesse de la méthode a été testée au cours d'un essai circulaire ayant impliqué cinq instituts avec un médicament vétérinaire (florfenicol) et un biocide (imidaclopride) en utilisant deux types de lisier différents. Le résultat de cet essai circulaire a été publié par l'Agence allemande pour l'environnement (UBA).

LD 467 : Approches définies pour l'irritation oculaire ou lésions oculaires graves

D'un point de vue historique l'évaluation des dangers oculaires était conduite in vivo chez le lapin (ligne directrice 405) et caractérisée en fonction de l'opacité de la cornée, l'inflammation de l'iris et la formation d'un œdème conjonctival. Depuis l'introduction de cette ligne directrice, plusieurs autres méthodes ont été traduites en lignes directrices (ex. test vitrigel, test macromoléculaire, épithélium cornéen reconstitué) afin de pouvoir élargir l'éventail d'outils pour la caractérisation du danger oculaire.

Cette disponibilité méthodologique en termes de protocoles expérimentaux pour l'évaluation du danger oculaire a contribué à motiver la mise en place d'approches définies (AD) pour cet effet néfaste. Les AD pour le danger oculaire,

portées par la France, ont été la deuxième série d'AD adoptée en qualité de ligne directrice après les AD pour la sensibilisation cutanée adoptées en 2021.

Les AD proposées par la France pour le danger oculaire sont destinées à évaluer le danger oculaire (irritation oculaire et lésions graves) et les lésions oculaires graves des produits chimiques selon trois catégories² du GHS des Nations Unies. Notamment, les DA sur le danger oculaire permettent de surmonter les difficultés que les méthodes *in vitro* individuelles rencontrent lors de l'identification des substances appartenant à la deuxième catégorie GHS.

Les deux DA et leurs sources d'information sont les suivantes :

- DAL-1 (pour les liquides purs non tensioactifs) : propriétés physicochimiques (Log P³, pression de vapeur, tension de surface), lignes directrices 492⁴ et 437⁵ de l'OCDE. Cette approche ne peut pas être appliquée aux mélanges chimiques ou aux UVCB⁶.
- DAL-2 (pour les liquides et solides purs et non tensioactifs et/ou dilués/dissous dans l'eau) : Ligne directrice 491⁷ de l'OCDE et Ligne directrice 437 de l'OCDE.

La fiabilité des deux AD a été évaluée (et considérée suffisante) par rapport à un jeu de données de référence sur le test *in vivo* de Draize sur la base de critères d'acceptation établis par le groupe d'experts sur les dangers oculaires de l'OCDE. Le jeu de données utilisé pour qualifier les DA était composée par des substances chimiques hétérogènes en termes de propriétés physicochimiques (volume moléculaire, niveau d'hydrophobicité).

LD 492 B : Méthode d'essai sur modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué pour l'identification de produits chimiques dangereux pour l'œil

Cette ligne directrice décrit une procédure *in vitro* permettant d'identifier les composés chimiques (substances individuelles et mélanges) ne nécessitant pas de classification (No Cat), nécessitant une classification pour irritation oculaire (Cat 2) et nécessitant une classification pour lésions oculaires graves (Cat 1) selon les catégories de danger oculaire du GHS des Nations Unies.

Le protocole expérimental de cette ligne directrice se base sur des analyses de viabilité d'un épithélium humain cornéen reconstitué (ECR, SkinEthic™) disponible dans le commerce et sur la prise en compte de plusieurs temps d'expositions (« time to toxicity », TTT). L'ECR a été conçu pour reproduire les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques de l'épithélium cornéen humain. Une étude de validation pour cette méthode a permis de conclure que la nouvelle ligne directrice 492B (ECR TTT) est capable d'identifier correctement les composés chimiques en discriminant les trois catégories du GSH.

Le test SkinEthic™ ECR TTT est basé sur deux protocoles, un pour les liquides (SkinEthic™ ECR TTL) et un pour les solides (SkinEthic™ ECR TTS). Le test SkinEthic™ ECR TTT utilise trois temps d'exposition pour le TTL et deux temps d'exposition pour le TTS. Les protocoles SkinEthic™ ECR TTL et TTS font appel à des modèles de prédiction différents qui prédisent le danger oculaire en fonction de critères de viabilité cellulaire spécifiques qui ont été choisis afin d'optimiser leur performance prédictive.

LD 470 : Essai de mutation du gène Pig-a sur érythrocytes de mammifères

Le test *in vivo* de mutation génique Pig-a sur érythrocytes utilise le gène du phosphatidylinositol glycan de classe A, comme indicateur (gène sentinelle) de mutations sur cellules somatiques. Les tests de mutation génique *in vivo*, tels que le test Pig-a, sont particulièrement pertinents pour évaluer la mutagénicité car des facteurs physiologiques, tels que les aspects toxicocinétiques et les processus de réparation de l'ADN, contribuent ensemble aux effets mutagènes. Pour ces raisons, l'essai *in vivo* Pig-a peut être utilisé pour approfondir les résultats obtenus suite à l'application d'essais *in vitro*.

² No Cat = absence de danger, Cat. 1 = effets irréversibles ; Cat. 2 = effets d'irritation réversibles (modérés et forts)

³ Coefficient de partage d'une substance chimique entre une phase aqueuse et l'octanol

⁴ Essai n° 492 : Méthode d'essai sur modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué pour l'identification de produits chimiques ne nécessitant aucune classification ni étiquetage pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves

⁵ Essai n° 437 : Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire

⁶ UVCB = « Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials ». C'est une entité chimique de composition inconnue ou variable, produit de réaction complexe ou de matériels biologiques

⁷ Essai n° 491 : Méthode d'essai d'exposition de courte durée *in vitro* pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.

La cinétique suivie par les cellules mutantes Pig-a est similaire à celle des cellules Pig-a de type sauvage, ce qui indique que les mutations mesurées dans le test Pig-a agissent comme si elles avaient un phénotype relativement neutre, c'est-à-dire qui ne confère pas d'avantage ou de désavantage à la croissance cellulaire. Bien que différents schémas de dosage aient été employés, un protocole d'une durée de 28 jours consécutifs de dosage, permet l'expression des mutants et de rendre compatible la réalisation de ce test lors d'études standard de toxicité à doses répétées.

LIGNES DIRECTRICES REVISEES

LD 442C : Sensibilisation cutanée *in chemico* (Essai portant sur l'événement clé relatif à l'établissement d'une liaison covalente avec les protéines, dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables)

La ligne directrice a été révisée pour mettre à jour la méthode d'essai ADRA⁸ pour la sensibilisation cutanée et les standards de performance pour les essais DPRA et ADRA. Le test ADRA a été adopté en 2019 comme ligne directrice. Cet essai a été conçu pour être utilisé dans une stratégie de tests intégrée, contribuant ainsi à la réduction de l'expérimentation animale. Afin d'actualiser cette ligne directrice⁹, le Japon a introduit les sept mises à jour suivantes :

1. Adoption d'une approche par concentration pondérale
2. Ajout d'une méthode de détection par fluorescence
3. Ajout des substances UVCB au domaine d'applicabilité du test
4. Révision des critères d'acceptabilité pour le contrôle de référence NAC¹⁰ lorsque le DMSO/Acétonitrile est utilisé comme solvant.
5. Ajout de l'acide squarique comme nouveau contrôle positif
6. Remplacement de trois substances d'épreuve de compétences
7. Révision des standards de performance suite à la substitution mentionnée au point précédent.

LD 442 E : Sensibilisation cutanée *in vitro* (Essai de sensibilisation cutanée *in vitro* portant sur l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables pour la sensibilisation cutanée)

La ligne directrice a été révisée de façon à intégrer la méthode GARD™_{skin} sous forme d'une nouvelle annexe. Cette méthode caractérise une signature biomarqueur génomique transcriptionnelle spécifique appelée signature génomique de prédiction identifiée dans la lignée cellulaire SenzaCell™ (un sous-clone de la lignée cellulaire de leucémie myéloïde MUTZ-3).

Cette approche doit être considérée en combinaison avec d'autres sources d'information dans le contexte d'une IATA¹¹. Les limitations connues de la méthode sont principalement liées à des problématiques de solubilisation des substances chimiques et des phénomènes d'auto-fluorescence pouvant interférer avec la cytométrie de flux.

LD 456 : Essai de stéroïdogénèse H295R

Le Royaume-Uni, a proposé une révision de la procédure d'interprétation des données issues de la ligne directrice 456 afin de réduire le taux de faux positifs. En effet, certains CRO et d'autres laboratoires ont signalé un nombre anormalement élevé de faux positifs, y compris pour des tests précédemment identifiés comme négatifs. Ce biais est dû à une procédure d'interprétation des données (DIP) basée exclusivement sur des critères de significativité statistique qui ne prend pas en compte la variabilité biologique. Le projet a été intégré dans le programme de travail en avril de cette année. La révision de la procédure d'interprétation des données a été conduite rapidement et la nouvelle version de la ligne directrice est désormais disponible sur le site web de l'OCDE.

⁸ Essai *in chemico* portant sur l'événement clé relatif à la formation d'une liaison covalente avec les protéines. L'essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés (ADRA) est une alternative à l'expérimentation animale pour la prédiction du potentiel de sensibilisation cutanée.

⁹ https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en

¹⁰ NAC = (N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine)

¹¹ Integrated Approaches to Testing and Assessment, Approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation

LD 488 : Essais de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques

La mise à jour¹² de la ligne directrice 488 détaillant les tests pour la détection des mutations génétiques somatiques et germinales chez les rongeurs transgéniques a été adoptée. Cette mise à jour a permis : (i) d'améliorer la détection des mutations des cellules germinales et (ii) d'harmoniser la ligne directrice 488 avec les autres documents de l'OCDE sur la caractérisation *in vivo* de la génotoxicité. Notamment, cette mise à jour a concerné un alignement entre cette ligne directrice et la nouvelle ligne directrice pour l'essai Pig-a et la ligne directrice 474 sur le test des micronoyaux.

Les lignes directrices suivantes ont fait l'objet de corrections mineures : **LD 117**, Coefficient de partage (n-octanol/eau), méthode HPLC ; **LD 123**, Coefficient de partage (1-octanol/eau) : méthode du brassage lent ; **LD 406**, Sensibilisation de la peau, **LD 425**, Toxicité aiguë par voie orale : méthode de l'ajustement des doses ; **LD 442D**, Sensibilisation cutanée *in vitro*. La modification de la ligne directrice 425 a été soumise à approbation écrite par rapport à une mise à jour des conditions d'hébergement et d'alimentation des animaux. Ces lignes directrices corrigées ont également été publiées le 30 juin 2022.

AUTRES DOCUMENTS APPROUVES

Standards de performance pour le test de phototoxicité conduit sur épiderme humain reconstitué

Ce projet propose des standards de performance (SP) qui permettent, de qualifier la fiabilité et pertinence de méthodes d'essai pour la photo-irritation cutanée modifiées qui sont structurellement et mécaniquement similaires (tests « me-too ») à la méthode d'essai décrite par la ligne directrice 498¹³.

Les SP décrivent : (i) les composants essentiels de la méthode d'essai ; (ii) les douze composés chimiques de référence, et (iii) une quantification de la fiabilité prédictive que les méthodes d'essai similaires devraient atteindre ou dépasser.

En termes de performance prédictive, le niveau de reproductibilité intra-laboratoire doit être caractérisé par une concordance parmi les prédictions (composés photo-toxiques vs. composés inoffensifs) égale ou supérieure à 90%. Ce seuil d'acceptabilité est, en revanche, égal à 80% pour la reproductibilité inter-laboratoire.

Révision de la note d'orientation sur l'absorption cutanée

Ce projet a concerné la mise à jour de la note d'orientation n° 156 sur l'absorption cutanée. Ce projet avait été proposé par l'EFSA et l'Allemagne en 2017, afin d'actualiser l'approche d'interprétation des données des études d'absorption cutanée, dans le contexte actuel caractérisé par une utilisation accrue des tests *in vitro*. Plusieurs sections du document ont été actualisées en fonction de l'expérience accumulée dans le cadre de l'évaluation des pesticides.

Test DPRA : considérations concernant l'implémentation de l'approche gravimétrique

Lors la réunion, le WNT a examiné une proposition du Japon pour mettre à jour l'essai de réactivité directe des peptides (DPRA) pour la sensibilisation cutanée afin de pouvoir établir la concentration d'un composé chimique grâce à une approche gravimétrique pour les composés chimiques dont le poids moléculaire demeure inconnu (ex. mélanges).

Le groupe d'experts sur la sensibilisation cutanée soutient l'utilisation de l'approche gravimétrique et recommande qu'une approche cohérente soit utilisée pour les essais ADRA et le DPRA. Toutefois, le groupe d'experts n'a pas pu parvenir à un consensus sur la question de l'analyse, à savoir si l'analyse présenté dans le document de réflexion est suffisante pour permettre l'utilisation de l'approche gravimétrique pour l'essai DPRA ou si des travaux supplémentaires sont nécessaires, et le cas échéant, lesquels.

Une approbation par écrit du WNT pour l'introduction de cette approche a été demandé et elle a donné lieu à un soutien sur le principe mais l'adoption de la méthode gravimétrique devra être justifiée par une étude conduite sur une vingtaine de substances.

¹² https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-488-transgenic-rodent-somatic-and-germ-cell-gene-mutation-assays_9789264203907-en

¹³ Essai n°498 : Phototoxicité *in vitro* - Essai sur épiderme humain reconstitué

Revue détaillée sur les versions miniaturisées du test d'Ames test

Le test de génotoxicité sur bactéries (décrit dans la ligne directrice 471 de l'OCDE) est parmi les tests les plus largement utilisés pour la caractérisation du potentiel mutagène des substances chimiques. Le format standard utilise des boîtes de Petri contenant un milieu de culture minimal. Plusieurs versions miniaturisées du test bactérien de mutation génique inverse ont été mises au point et sont déjà utilisées, notamment dans un contexte industriel. Ces versions miniaturisées nécessitent de quantités réduites de produits et elles offrent la possibilité d'analyser simultanément un grand nombre d'échantillons.

Cependant, ces tests miniaturisés ne sont pas décrits dans aucune ligne directrice de l'OCDE, ils ne bénéficient pas de l'acceptation mutuelle des données (AMD). Pour remédier à ce manque, un projet de l'OCDE a été lancé pour rédiger une revue détaillée afin d'identifier les éléments pouvant empêcher une acceptabilité réglementaire des tests d'Ames miniaturisés.

Les conclusions des analyses conduites lors de la rédaction de la revue approfondie ont permis d'établir qu'il n'existe actuellement aucun consensus sur l'utilisation réglementaire des méthodes miniaturisées même s'il y a une bonne concordance entre les résultats des tests miniaturisés et ceux des tests standards. Cependant, cette analyse de concordance est restée qualitative et elle n'a pas pris en compte les aspects quantitatifs comme ceux liés à l'identification des mutagènes qui produisent des réponses faiblement positives.

Pour ces raisons, aucun des quatre tests de mutation génique inverse bactérienne miniaturisés évalués n'a pas pu, à ce stade, être recommandé comme alternative la ligne directrice 471 de l'OCDE ou pour inclusion dans ce document.

Toutefois, étant donné qu'il existe des domaines d'application pour les tests miniaturisés (par exemple si la quantité de substance à tester est un facteur limitant) et que les résultats de l'étude rétrospective sont prometteurs, il est recommandé de mener des travaux supplémentaires concernant l'exploitation quantitative des données recueillies.

En effet, des analyses quantitatives de suivi des données concentration-réponse collectées pourraient ainsi fournir des indications sur la variabilité inter et intra-laboratoire pour chacun des tests examinés et pourraient constituer un bon point de départ pour des études de validation.

Etude et document guide préliminaire sur l'adaptation du test *in vitro* des micronoyaux pour les essais sur les nanomatériaux

Ce document s'inscrit dans le projet 4.95, qui visait à élaborer un document d'orientation sur l'adaptation aux nanomatériaux des lignes directrices de génotoxicité *in vitro* à base de cellules de mammifères. Ce projet a été initialement proposé par le JRC en 2014. Lors de la réunion des Coordinateurs Nationaux en avril 2021, le JRC a présenté l'état d'avancement du projet et a indiqué qu'il n'était plus en mesure d'assurer la poursuite du projet. Un appel à d'autres pays pour (co-)piloteur, a conduit le Royaume-Uni et l'Allemagne à se porter volontaires pour une action limitée à la production d'un rapport sur les travaux menés sur un protocole adapté. L'ensemble du projet était divisé en 3 phases : clarification des principales questions techniques ; comparaison inter laboratoire et développement de recommandations.

Afin de partager les enseignements tirés des travaux expérimentaux menés jusqu'à présent dans le cadre de ce projet et d'orienter les utilisateurs de la ligne directrice 487 lors des essais réalisés avec des nanomatériaux manufacturés, il a été convenu de publier le document, en gardant à l'esprit qu'il sera affiné à l'avenir avec les données générées sur d'autres nanomatériaux manufacturés.

Le document a été adopté en l'état. La proposition a été émise de soumettre un nouveau SPSF pour reprendre les travaux.

Revue détaillée sur les tests *in vitro* portant sur l'immunotoxicité avec un focus sur l'immunosuppression

Cette revue détaillée a analysé les tests d'immunotoxicité *in vitro*, couvrant principalement l'immunosuppression, et défini une approche par niveaux pour l'évaluation du potentiel d'immunosuppression des composés chimiques.

L'approche proposée commence par l'évaluation de la myélotoxicité (niveau 1). Si les composés chimiques ne sont pas potentiellement myélotoxiques, ils doivent être testés pour la leucotoxicité directe, définie comme la toxicité pour toute cellule des lignées lymphoïdes ou myéloïdes (niveau 2). Les composés doivent ensuite être testés pour l'immunotoxicité à des concentrations non cytotoxiques en utilisant diverses approches, telles que la production de

cytokines, la réponse anticorps dépendante des cellules T, le test de prolifération lymphocytaire, la réaction leucocytaire mixte et le test des cellules tueuses naturelles (niveau 3).

À l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur les tests *in vitro* à utiliser, ni sur la manière de le faire, et il n'existe pas de lignes directrices de l'OCDE pour détecter l'immunotoxicité des substances chimiques. Selon les préconisations de la revue détaillée, tout test validé devrait donc faire partie d'une large batterie de tests différents couvrant tous les types d'immunotoxicité, y compris l'immunosuppression, la sensibilisation et l'auto-immunité. Le test MITA¹⁴ est un exemple de combinaison d'essais *in vitro* qui peut être utilisé pour prédire l'immunotoxicité des substances chimiques et qui pourrait être considéré comme une future approche potentielle de niveau 3.

➔ Nouveaux sujets intégrés dans le programme de travail

Vingt nouveaux projets, dont le titre et les pays concernés sont reportés dans le tableau page suivante, ont été soumis à l'attention de coordinateurs nationaux lors de la réunion :

Tableau 1. Nouveaux projets soumis au 34^{ème} WNT

#Projet	Titre	Pays
1	<i>Sediment-Water Amphipod Toxicity Test Using Spiked Sediment</i>	JP/FR
2	<i>Revision of sediment–water Chironomus test using spiked-sediment or spiked-water (OECD 218 and 219)</i>	GER/CH
3	<i>Revision of the OECD Guidance Document 75 (guidance document on the honeybee (Apis mellifera L.) brood test under semi-field conditions);</i>	GER
4	<i>Revision of Guidance Document 317 on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials to provide further guidance on conducting assays with manufactured nanomaterials according to OECD Test Guidelines 201, 202, and 203</i>	FR/ESP
5	<i>Guidance Document on Integrated in vitro Approach for Intestinal Fate of Orally Ingested Nanomaterials</i>	IT
6	<i>OptiSafe™ Macromolecular Eye Irritation Test</i>	US
7	<i>Eye hazard identification: Defined Approach for Surfactants</i>	FR
8	<i>Defined Approach on Skin Sensitisation for similar methods in TG 442C TG442D and TG 442E</i>	US
9	<i>Feasibility Study on Inclusion of the Skin Allergy Risk Assessment (SARA) Model into OECD Guideline 497 on Defined Approaches for Skin Sensitisation</i>	US/UK
10	<i>Epidermal Sensitization Assay (EpiSensa): An In Vitro Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals</i>	JP
11	<i>Support of the review of data supporting the use of the LLNA: BrdU-ELISA method for UN GHS classification for skin sensitisation</i>	OCDE/JP
12	<i>Use of an interleukin-2 luciferase lymphotoxicity test for identifying the immunotoxic potential of chemicals that is caused by anti-proliferative effects</i>	JP
13	<i>In vivo mammalian comet assay (OECD TG 489) on gonadal cells to study germ cell specific genotoxic effects</i>	NO/DK
14	<i>Support the work on the criteria for classification for germ cell mutagenicity</i>	EC/JRC et OCDE
15	<i>TG 456 Steroidogenesis assay correction in the Data interpretation procedure¹⁵</i>	UK/OCDE
16	<i>LCMS/MS based steroidogenesis profiling-enhancement of TG 456</i>	FR
17	<i>Stably transfected human glucocorticoid receptor hGR transcriptional activation assay for detection of agonistic and antagonist activity of chemicals towards hGR</i>	FR/CAN
18	<i>Development of a Test Guideline based on the hPlacentox method for endocrine disruptors effect assessment on human placental model</i>	FR
19	<i>Detailed review paper on methods and feasibility assessment to enable inclusion of mammary gland whole mount collection and evaluations</i>	DK/US
20	<i>Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)</i>	JP/US

¹⁴ Multi-ImmunoTox Assay. Le test *in vitro* MITA est une approche permettant de détecter les composés chimiques immunotoxiques grâce à une combinaison de 3 lignées cellulaires exprimant le plasmide rapporteur luciférase de façon stable. Les cellules 2H4 sont utilisées pour évaluer les effets des produits chimiques sur l'activité des promoteurs de l'interleukine 2 et de l'interféron gamma. Les cellules THP-G1b évaluent l'activité du promoteur de l'interleukine 1 tandis que les cellules THP-G8 évaluent l'activité du promoteur de l'interleukine 8.

¹⁵ La révision a été conduite rapidement après intégration du projet dans le programme de travail. La nouvelle version est disponible sur le site de l'OCDE (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>)

NOUVEAUX PROJETS PORTES PAR LA FRANCE

Six nouveaux projets (Tableau 1) relatifs aux sections 2 et 4 ont été proposés par la France, en porteur unique ou en collaboration avec un autre pays. Les paragraphes suivants détaillent le contenu de ces projets.

Approche définie pour le danger oculaire

L'objectif de ce projet est de développer une nouvelle approche définie pour la caractérisation de l'irritation oculaire pour les composés chimiques liquides, semi-solides et solides ayant des propriétés tensioactives. En effet, le projet de ligne directrice adopté en avril 2022 et portant sur une approche définie pour le même effet néfaste, ne peut pas prendre en compte cette catégorie chimique en raison d'un taux de faux négatifs particulièrement élevé (42%).

Pour cette raison, une approche définie alternative a été élaborée pour la caractérisation du danger oculaire des composés tensioactifs capable de prendre en compte les trois catégories du système général harmonisé de classification et d'étiquetage : la catégorie 1 (Cat. 1) pour les "lésions oculaires graves", la catégorie 2 (Cat. 2) pour l'"irritation oculaire" et l'absence de catégorie (No Cat.) pour les substances "ne nécessitant pas de classification ni d'étiquetage" pour cet effet néfaste. La stratégie toxicologique de ce projet est basée sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes d'essai décrites dans la ligne directrice 491 (essai *in vitro* de courte durée sur fibroblastes de lapin) et 492 (essai *in vitro* sur épithélium cornéen humain reconstitué).

Cette approche définie a été élaborée à partir d'une analyse statistique approfondie d'une base de données de tensioactifs pour laquelle il existe des données *in vivo* (test de Draize).

Amélioration de la ligne directrice 456 par analyse LCMS/MS

La ligne directrice 456 décrit un essai de stéroïdogénèse sur cellules H295R issues d'un corticosurrénalome primaire humain, a été adoptée en 2011 et révisée en 2022 (voir p 5). Il mesure les changements relatifs de la sécrétion d'estradiol et de testostérone en culture cellulaire.

L'objectif de ce projet, porté par la plateforme publique-privée PEPPER, 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 (dont le suivi par méthode immuno-enzymatique serait difficile), ainsi qu'au fait que ce type d'équipement est disponible dans de nombreux laboratoires.

L'augmentation du nombre de paramètres mesurés dans la TG 456, au-delà de l'estradiol et de la testostérone, maximiserait son utilité réglementaire en donnant plus d'informations sur la perturbation de la stéroïdogénèse, grâce à une identification des modes d'action endocriniens au-delà des œstrogènes et des androgènes.

L'augmentation du nombre de paramètres mesurés nécessitera d'étendre/modifier la procédure d'interprétation des données et le modèle de prédiction, en tenant compte des discussions en cours.

Test d'activation transcriptionnelle du récepteur humain des glucocorticoïdes (hGR)

Le hGR est impliqué dans plusieurs processus physiologiques comme la réponse au stress, le système immunitaire et le métabolisme.

Son expression est ubiquitaire et ses ligands comprennent les glucocorticoïdes endogènes et synthétiques tels que le cortisol, la dexaméthasone et la prednisolone.

En raison de l'implication du hGR dans des processus physiologiques d'importance primordiale, il est important d'évaluer la capacité des produits chimiques à interférer avec ce récepteur nucléaire. L'importance de ce récepteur a été soulignée dans la revue détaillée¹⁶ de l'OCDE sur l'état de l'art concernant les nouvelles méthodes de dépistage des perturbateurs endocriniens, ainsi que dans le projet en cours concernant une revue détaillée sur l'état de l'art de la perturbation métabolique par les produits chimiques (projet 4.147).

Pour ces raisons, le projet porté par la France basé sur un essai *in vitro* utilisant un gène rapporteur spécifiquement activé par le hGR comble une lacune réglementaire particulièrement pertinente au sein du programme de l'OCDE.

¹⁶ [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)23&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)23&doclanguage=en)

Essai hPlacentox pour l'évaluation des effets des perturbateurs endocriniens sur un modèle placentaire humain

La grossesse est une période de sensibilité aux xénobiotiques, pouvant avoir un impact sur la santé maternelle et sur celle du fœtus.

Dans le contexte physiologique de la grossesse, le placenta recouvre un rôle essentiel et le placenta humain est très différent par rapport à celui des autres mammifères placentaires. Le placenta n'est pas seulement une barrière mais il est aussi un organe cible 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.

En particulier, le placenta contrôle la sécrétion d'hormones stéroïdes et peptidiques. Au niveau cellulaire, le récepteur P2X7, connu pour son implication dans les maladies dégénératives, joue un rôle clé dans l'altération du placenta. L'objectif de ce projet, porté par la plateforme PEPPER, 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. Dans le cadre du programme des lignes directrices de l'OCDE, cet essai permettrait de combler une lacune concernant l'évaluation des effets des xénobiotiques sur un organe dont l'importance physiologique est vitale.

Test de toxicité sur amphipodes dans un système eau-sédiment dopé

Ce projet a pour objectif de développer 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 a été proposé de structurer le projet de ligne directrice en deux parties : un essai de toxicité subchronique de 10 jours et 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 publiés par plusieurs organisations de normalisation (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, préalables à la réalisation d'un essai d'inter comparaison, vont permettre de sélectionner les conditions expérimentales les plus pertinentes de façon à améliorer la comparabilité des données d'écotoxicité obtenues.

Révision du document guide 317 relatifs aux essais toxicologiques sur nanomatériaux dans les milieux aquatique et sédimentaire afin de fournir des orientations supplémentaires sur la réalisation d'essais conformément aux lignes directrices 201, 202 et 203

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 MNs 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 MNs qui peuvent potentiellement interférer avec les méthodes de quantification de la biomasse algale) seront également détaillées dans ces annexes. Ces travaux expérimentaux sont menés dans le cadre du programme Européen NanoHarmony.

AUTRES NOUVEAUX PROJETS ACCEPTES

Tous les autres projets cités dans le Tableau 1 ont été retenus et leur tenants et aboutissants sont résumés dans les paragraphes suivants.

Révision des lignes directrices 218 et 219 relatives aux essais sur chironomes dans un système eau-sédiment chargé et eau chargée-sédiment

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 soulevés dans le cadre des évaluations de l'EFSA. Les principaux objectifs de ce projet 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.

Révision du Document Guide 75 (guidance document on the honeybee (*Apis mellifera* L.) brood test under semi-field conditions)

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, qui a été adopté, a pour donc objectif de proposer une version révisée du document guide intégrant ces améliorations.

Document guide sur la caractérisation *in vitro* du transit gastro-intestinal des nanomatériaux ingérés

Ce projet se propose d'élaborer une approche intégrée *in vitro* pour la caractérisation du devenir gastro-intestinal des nanomatériaux une fois ingérés. Cette approche intégrée est censée reproduire *in vitro* les deux premières étapes du processus de digestion, c'est-à-dire le comportement des nanomatériaux dans les différents compartiments digestifs (bouche, estomac, intestin) et leurs interactions avec la muqueuse intestinale.

Sur la base d'une analyse bibliographique approfondie les meilleures techniques analytiques pour la détection des NMs dans les matrices biologiques seront identifiées. La robustesse et la reproductibilité des protocoles proposés seront évaluées par des tests inter-laboratoire. À ce jour, aucun document de l'OCDE existant ou en cours de rédaction ne traite le même sujet.

Le test macromoléculaire OptiSafe™ pour l'irritation oculaire

Ce projet a pour objectif d'intégrer la méthode d'essai d'irritation oculaire OptiSafe™ dans la ligne directrice 496 (Méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* pour l'identification de produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves). Cet ajout mettra à disposition un test d'irritation oculaire alternatif à l'expérimentation animale à haute sensibilité et non pas impacté par la stabilité des réactifs. Des procédures ont été développées pour un large éventail de propriétés physicochimiques des produits chimiques et des mélanges.

Le test OptiSafe™ est applicable aux liquides et aux solides solubles et insolubles dans l'eau. Des études de validation ont démontré qu'OptiSafe™ est caractérisé par un taux de faux négatifs de 0% et une précision approchant le 80%. Lors d'un test comparatif, la précision et la sensibilité d'OptiSafe™ se sont avérées être meilleures que celles caractérisant les méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour le même effet néfaste et répertoriées par

l'OCDE. Sur la base des résultats obtenus, aucun produit chimique de catégorie 1 du SGH, y compris ceux mal classés par d'autres tests macromoléculaires, n'est classé comme NC.

Intégration de méthodes "me-too" au sein des approches définies pour la sensibilisation cutanée (TG 442C TG442D et TG 442E)

L'objectif de cette proposition est d'appliquer le cadre d'évaluation de la TG 497 sur les approches définies (AD) pour la sensibilisation cutanée aux AD (2o3, ITS), mais avec d'autres sources d'information. Ces sources d'information "me-too" proviendraient des lignes directrices correspondantes sur les essais basés sur les événements clés pour les essais *in chemico* et *in vitro* (TG 442C, 442D et 442E) ou de modèles *in silico* qui démontrent une performance et une fiabilité équivalentes à celles de la version actuelle de la ligne directrice. Les substitutions de sources d'information "me-too" dans les AD respectives dépendront de la disponibilité des données et de la capacité d'adapter la procédure d'interprétation des données.

Étude de faisabilité pour l'inclusion putative du modèle d'évaluation du risque d'allergie cutanée (SARA) au sein de la ligne directrice 497 sur les approches définies pour la sensibilisation cutanée

L'objectif de cette proposition est de déterminer la faisabilité de l'inclusion d'une autre approche définie *in silico* pour la sensibilisation cutanée à la TG 497. Cette approche définie supplémentaire se base sur le modèle d'évaluation du risque d'allergie cutanée (SARA), et elle fournirait un résultat quantitatif permettant d'établir un point de départ pour l'évaluation quantitative des risques. Il s'agirait d'une intégration digne d'attention car la TG 497 contient actuellement des approches de classification ne permettant pas une quantification du danger.

Le modèle SARA est un modèle *in silico* qui utilise une approche statistique bayésienne pour prédire quantitativement le pouvoir de sensibilisation de la peau humaine en se basant sur n'importe quelle combinaison de données issues du test HRIPT (Human Repeated Insult Patch Test), du test de réactivité peptidique (DPRA ; TG 442C), du test KeratinoSensTM (TG 442D), du test h-CLAT (TG 442E) et du test U-SENSTM (TG 442E).

Le modèle SARA fait partie du projet d'études de cas pour les IATA17 et il est actuellement examiné par l'OCDE. Le modèle SARA a également été utilisé dans des études de cas mises en place par Cosmetics Europe pour élaborer un point de départ pour l'évaluation des risques. En effet, ce modèle permet de prédire la concentration susceptible de sensibiliser 1 % d'une population.

Essai *in vitro* EpiSensA pour la caractérisation de la sensibilisation cutanée

L'objectif du projet est d'établir une nouvelle ligne directrice basée sur une méthode *in vitro* pour identifier le potentiel de sensibilisation cutanée des composés chimiques. Le test de sensibilisation EpiSensA est un test basé sur l'épiderme humain reconstitué et il suit l'expression de quatre gènes liés aux réponses critiques des kératinocytes pendant la sensibilisation cutanée (ATF3, IL-8, GCLM et DNAJB4).

En utilisant 136 produits chimiques parmi lesquels des composés chimiques lipophiles et des pré/pro-haptènes ont été considérés, la méthode EpiSensA a démontré un domaine d'application plus large et une précision de classification plus élevés que l'approche LLNA.

Cette méthode est destinée à être utilisée en conjonction avec d'autres approches (par exemple les essais DPRA, KeratinoSens et h-CLAT) au sein d'une batterie d'essais.

À la suite des commentaires du WNT la chronologie de ce projet a été décomposé en deux phases : une étude de faisabilité dont le jalon final sera une consultation du WNT à l'issue de l'examen par les pairs et une phase de développement de la ligne directrice.

¹⁷ Integrated Approaches to Testing and Assessment, approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation

Soutien pour la qualification des données issues de la méthode LLNA:BrDU-ELISA¹⁸ pour la classification GHS de la sensibilisation cutanée

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 (catégories 1A/1B pour la sensibilisation cutanée) sur la base de résultats issus de la méthode LLNA:BrDU-ELISA (OCDE TG 442B). Les Nations Unies ont demandé que le groupe d'experts de l'OCDE entreprenne une révision des données afin de pouvoir corroborer la proposition du Japon.

A la lumière de ce constat, l'objectif de ce projet est de revoir le contexte scientifique de l'approche LLNA:BrDU-ELISA et de parvenir à une conclusion sur l'adéquation des données issues de cette méthode pour sous-catégoriser le potentiel sensibilisant des substances chimiques.

Utilisation d'un test de lymphotoxicité basé sur le système interleukine-2 luciférase pour identifier le potentiel immunotoxique, causé par des effets anti-prolifératifs, des composés chimiques

Le test de l'interleukine-2 luciférase (« IL-2 Luc assay »), a déjà été inclus au sein du plan de travail, avait été mis au point pour caractériser l'immunotoxicité des produits chimiques qui perturbent la transcription de l'IL-2 par les cellules T. Le Japon a récemment mis au point une nouvelle méthode qui est une modification du test IL-2 Luc et qui est destinée à détecter les effets antimitotiques des substances chimiques ayant un potentiel d'immunosuppression. Ce test sera l'une des composantes d'une IATA17 pour caractériser, *in vitro*, le potentiel immunotoxique des composés chimiques.

Le WNT a tenu à souligner son soutien à ce projet tout en reconnaissant le rôle de pionnier du Japon sur les aspects immunologiques.

Essai *in vivo* des comètes (OCDE LD 489) sur les cellules gonadiques pour étudier les effets génotoxiques spécifiques des cellules germinales

L'objectif principal de ce projet est de modifier la LD 489 (essai *in vivo* des comètes chez les mammifères) pour faciliter la collecte de données sur la génotoxicité spécifique vis-à-vis des cellules germinales mâles.

Les méthodes actuelles pour l'étude de la mutagénicité des cellules germinales sont souvent coûteuses, et/ou nécessitent de nombreux animaux, ce qui limite considérablement leur utilisation. En revanche, l'essai *in vivo* des comètes en conditions alcalines chez les mammifères est relativement économique et facile à réaliser tout en ne nécessitant qu'un nombre limité d'animaux.

Dans sa version actuelle, la LD 489 ne peut pas caractériser les effets génotoxiques dans les cellules germinales. Pour cette raison le projet scandinave vise à développer une version révisée de la LD 489 qui inclut l'analyse de données provenant de cellules germinales spécifiques (spermatides rondes et spermatocytes primaires) sans faire recours à des animaux supplémentaires lors de l'expérimentation (principe du raffinement).

Une discussion lors de la réunion a motivé la subdivision du projet en plusieurs étapes d'évaluation qui auront lieu lors des trois premières années du projet.

¹⁸ Une modification non radioactive du protocole de la méthode LLNA pour l'identification des substances chimiques pouvant induire une sensibilisation cutanée

Travail de soutien pour la révision des critères de classification pour la mutagenèse des cellules germinales

Lors de la 39^{ème} réunion du sous-comité GHS de l'ONU, l'Union Européenne a proposé de créer un groupe informel de travail sur la clarification des critères de classification¹⁹ de la mutagenicité des cellules germinales dans la catégorie 1B et, plus largement, de procéder à une mise à jour du chapitre 3.5 du GHS de l'ONU, sur la mutagenicité des cellules germinales. La tâche initiale du groupe informel de travail était de convenir des termes de référence et du programme de travail, qui ont été étendus à la révision des critères pour toutes les catégories, y compris la catégorie 1A et la catégorie 2.

En tant que référence technique pour le GHS, le rôle de l'OCDE dans le contexte de ce projet (approuvé par le WNT sans commentaire majeur) sera de conduire une analyse des critères révisés par un groupe officiel d'experts.

En ce qui concerne le contexte réglementaire de ce projet il faut souligner que plusieurs experts dans le domaine de la génotoxicité ont affiché des opinions divergentes quant à la mise en œuvre du GHS actuel. En particulier, l'exigence de "démontrer la capacité de la substance ou de son (ses) métabolite(s) à interagir avec le matériel génétique des cellules germinales" a causé des difficultés dans la classification en catégorie 1B. La proposition faite par l'Union européenne lors de la 39^{ème} session du sous-comité SGH de l'ONU était de modifier cette formulation qui est sujette à des interprétations différentes.

Revue détaillée sur la faisabilité de l'inclusion de l'observation microscopique de la totalité des tissus de la glande mammaire chez le rat

L'incidence du développement précoce des glandes mammaires, du cancer pré-ménopausique du sein et de la lactation insuffisante ou écourtée a augmenté dans le monde entier. Ces problèmes de santé des jeunes femmes 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.

Ce projet propose une revue détaillée axée autour l'observation microscopique de la totalité des tissus de la glande mammaire (« Whole Mount », WM) chez le rat et d'une analyse des données récemment publiées/générées grâce à cette approche afin de prouver que l'évaluation de la WM permet de détecter les effets néoplasiques microscopiques et organisationnels persistants induits par les composés chimiques qui peuvent ne pas être détectés lors d'autopsies. L'objectif ultime du projet est de conduire à l'amélioration de la ligne directrice 443²⁰ afin d'inclure l'adoption de cette approche.

Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez le médaka (MEOGRT)

L'objectif principal de la révision de cette ligne directrice 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 a été 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.

¹⁹ Catégorie 1A : composés chimiques connus pour induire des mutations héréditaires - preuves positives provenant d'études épidémiologiques humaines.

Catégorie 1B : composés chimiques connus pour induire (ou considérés comme induisant) des mutations héréditaires dans les cellules germinales humaines sur la base de résultats positifs observés *in vivo* sur cellules germinales de mammifères ; ou résultats positifs de tests de mutagenicité *in vivo* sur des cellules somatiques de mammifères, associés à des informations indiquant que la substance est susceptible de provoquer des mutations touchant les cellules germinales ; ou résultats positifs obtenus grâce à des tests montrant des effets mutagènes dans les cellules germinales de l'homme, sans démonstration de la transmission à la descendance.

Catégorie 2 : composés chimiques pouvant induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales humaines. Evidence expérimentale obtenue grâce à des expériences sur des mammifères (tests de génotoxicité sur cellules somatiques) et/ou dans certains cas à partir d'expériences *in vitro*.

²⁰ Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération

Prise en compte des technologies émergentes par le programme sur les lignes directrices : un séminaire en décembre

Le secrétariat de l'OCDE a porté l'attention du WNT sur les évolutions régulières qui caractérisent les sciences toxicologiques et sur la nécessité d'aligner les aspects réglementaires à ces évolutions.

Lors des dernières années, le WNT a examiné un certain nombre de projets relatifs aux NAM (nouvelles approches méthodologiques). Ceci a mis en évidence, au sein du WNT des problématiques nouvelles pouvant nécessiter de développer des approches de validation /normalisation alternatives et, de façon plus générale, et un besoin de connaissances spécifiques en termes d'expertise.

Il faut aussi signaler que ces projets portant sur les NAM sont accompagnés par un niveau d'information hétérogène et l'objectif des essais n'est pas toujours bien défini dès le départ. De plus, plusieurs questionnements relatifs à la transparence des NAM et à la gestion des données pouvant être générées par ces approches ont émergé au sein du WNT.

Pour ces raisons des discussions sont nécessaires pour définir les orientations qui permettront de moderniser le programme des lignes directrices vis-à-vis des NAM.

Pour répondre à ce besoin d'échange d'idées le WNT a approuvé la planification d'un séminaire interne qui se tiendra en décembre 2022. Plusieurs webinaires visant à la préparation de cet événement seront organisés par l'OCDE.

Nouveau groupe d'experts sur les méthodes de perturbation de la thyroïde

L'AG EDTA a conseillé de former un groupe d'experts pour coordonner le développement de lignes directrices pour les méthodes *in vitro* liées à la thyroïde et d'autres projets connexes. En effet, plusieurs initiatives internationales axées autour des méthodes *in vitro* pour la caractérisation des événements moléculaires initiateurs (et autres événements clés) liés au métabolisme thyroïdien ont mis à disposition des essais reconnus par l'EDTA comme pertinents pour l'élaboration de lignes directrices.

Ce nouveau groupe d'experts suivra :

- L'examen des méthodes relatives à la thyroïde concernant l'activité NETVAL de l'UE et d'autres initiatives importantes axées autour du développement de tests *in vitro* pour la thyroïde,
- La prise en compte de stratégies de test intégrées afin d'analyser comment ces tests et d'autres, lorsqu'ils sont combinés, peuvent prédire efficacement les dangers de perturbation de la thyroïde,
- La qualification (et putative extension) des listes de composés chimiques reconnus pour pouvoir impacter la thyroïde

La France a nommé cinq experts au sein de ce nouveau groupe de travail.

Activités en cours et jalons réalisés dans le cadre du programme de développement des chemins de l'effet néfaste (AOP)

Les AOP suivants ont été soumis à l'attention du WNT afin de les classer par rapport à leur pertinence réglementaire :

- Wnt ligand stimulation and Wnt signalling activation lead to cancer malignancy,
- Thyroid receptor antagonism leading to decreased cognitive function,
- Frustrated Phagocytosis-induced lung cancer,
- Lung Surfactant function disruption leading to acute lung toxicity,
- Interactions with lung tissues leading to lung fibrosis via a pathway involving Trefoil Factor 2,
- The development of adverse outcome pathways relevant to space flight health outcomes,
- Perturbed androgen signaling leads to short male anogenital distance, Network of AOPs 305-307,
- Binding to voltage gate sodium channel leading to developmental neurotoxic effects (and acute neurotoxicity),
- The AOPs for mitochondrial dysfunction in aquatic organisms, network of AOPs 263-268,
- AOPs leading to decreased population trajectory in fish, AOPs 348 and 349,
- AOP on Inhibition of Chitin Synthesis and Chitin Degradation in Arthropods, network of AOPs 358-361,

- Toll-like receptor 4 activation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma inactivation leading to pulmonary fibrosis,
- CIAO (Modelling the pathogenesis of COVID-19 using the Adverse Outcome Pathway) overarching project,
- Inhibition of ALDH1A leads to decreased fertility, females, AOP 398,
- Development of an AOP for celiac disease,
- Inhibition of mitochondrial electron transport chain (ETC) complexes leading to kidney toxicity.

L'adoption en juin 2021 du document guide pour l'évaluation scientifique des AOP²¹ (DG-AOP) représente un jalon important pour le programme portant sur le développement de ces derniers.

La revue « Environmental Toxicology and Chemistry » (ET&C) a développé un format d'article dédié à la publication d'AOPs. L'AOP sur l'inhibition de la chitine synthase 1 conduisant à une mortalité accrue chez les arthropodes a été le premier AOP publié par cette revue²². Cet AOP a été analysé selon les préconisations du DG-AOP.

Le Secrétariat a préparé un mémorandum d'entente qui définit les conditions de coopération entre l'OCDE et une revue scientifique. Le point principal du mémorandum, c'est une conformité avec les principes évoqués au sein du DG-AOP. De cette façon, un AOP peut être soumis à l'approbation du groupe de travail EAGMST après avoir été accepté par le journal, sans nécessiter d'autres évaluations scientifiques.

Au sein du regroupement de projets EURION (European cluster to improve Identification Of endocrine disruptors) un groupe de travail AOP²³ a été créé pour soutenir et faciliter les activités liées aux AOP et identifier les domaines spécifiques de collaboration entre les projets EURION.

Document guide sur la batterie d'essais *in vitro* pour la neurotoxicité du développement

Le projet pour l'écriture de ce document guide a été initié grâce à une collaboration entre le JRC et l'EFSA. L'objectif de cette collaboration était de proposer des principes pour la mise en place d'une batterie de tests *in vitro* pouvant répondre à des questions réglementaires en termes de caractérisation de la toxicité neurodéveloppementale (TND). Ce travail recourt au concept de IATA¹⁷ afin de structurer les applications des tests identifiés comme pertinents et le guide sera complété par plusieurs études de cas (deltaméthrine, flufénacet, néonicotinoïdes, retardateur de flamme, glufosinate).

Les deux limitations principales de ces approches résident dans le manque d'une compétence métabolique et dans une prise en compte insuffisante d'effets TND liée à une perturbation endocrinienne.

Le document TDN a été soumis à l'attention d'un groupe d'experts en mars et une version finale du document guide devrait être communiquée aux coordinateurs nationaux au cours de l'été 2022.

Développement de modalités de rapportage pour les données -omiques

L'objectif de cette initiative est de mettre à disposition des modalités de rapportage pour les données omiques sous un format pouvant permettre une évaluation de leur qualité, leur interprétation et la reproductibilité des résultats obtenus sur la base de ces données. Ces cadres de référence ont été prévus pour les données transcriptomiques et métabolomiques et leurs versions provisoires sont disponibles, ensemble aux documents guides correspondants, sur le site web de l'OCDE²⁴.

En parallèle, un article²⁵ publié par le journal « Regulatory Toxicology and Pharmacology » présente l'historique et les tenants et aboutissants de ce travail conduit à l'OCDE.

Ces modalités de rapportage sont composées par quatre sections : le résumé de l'étude, les caractéristiques principales de l'étude toxicologique *in vivo* ou *in vitro* qui a généré les échantillons analysés, la procédure d'acquisition/traitement des données et l'analyse finale des données (ex. identification de gènes différenciellement exprimés).

²¹ [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-CBC-MONO\(2021\)22%20&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-CBC-MONO(2021)22%20&doclanguage=en)

²² <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.5058>

²³ <https://eurion-cluster.eu/about/eurion-working-groups/>

²⁴ <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/omics.htm>

²⁵ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34333066/>

Réactualisation des documents guides pour l'utilisation réglementaire des prédictions QSAR

Les travaux de réactualisation des documents guides pour l'utilisation réglementaire des prédictions QSAR a débuté en mars 2021 et ils se poursuivront jusqu'au mois de février 2023. Ces travaux se proposent notamment de mettre à jour le formulaire QPRF²⁶ pour la qualification des prédictions élaborées par des modèles QSAR alors que le formulaire QMRF²⁷ dédié à la qualification des modèles QSAR sera transposé tel quel.

A l'état actuel un « QSAR Assessment framework » est en train d'être finalisé. Ce document est ainsi constitué :

- Section dédiée à l'analyse et qualification des modèles QSAR. Une section largement basée sur les documents existants mais avec des mises à jour ponctuelles,
- Section dédiée à l'analyse et qualification des prédictions QSAR,
- Liste de vérification pour la qualification des modèles QSAR. Une liste largement basée sur le QMRF actuel,
- Liste de vérification pour la qualification des prédictions QSAR. Cette liste est censée servir de base pour une mise à jour du QPRF,
- Annexe 1 : QPRF actualisé,
- Annexe 2 : instructions pratiques pour la compilation de la liste de vérification pour les prédictions QSAR et mise en relation entre celle-ci et le QMRF et QPRF.

Lors du deuxième semestre 2022, les travaux porteront essentiellement sur la finalisation des listes de vérification et sur l'analyse critique d'études de cas.

Série de webinaires sur l'utilisation des nouvelles approches méthodologique (NAM) lors de l'évaluation des risques des substances chimiques

Une série de webinaires organisée conjointement par PETA, l'EPA et le PCRM et dédiée à aux nouvelles approches méthodologiques a été mise en ligne. Une liste des webinaires est disponible à l'adresse suivante : <https://www.theptsci.eu/nam-webinars/>.

→ Consultations publiques en cours

L'OCDE soumet les projets inscrits dans le programme de travail à des consultations publiques au cours de l'année (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/chemicalstestingdraftoecdguidelinesforthetestingofchemicals-sections1-5.htm>).

Appel à experts

Si vous avez une expertise en écotoxicologie et/ou toxicologie et vous souhaitez contribuer à une relecture critique de ces documents vous pouvez contacter les coordinateurs nationaux dont les coordonnées sont rappelées ci-dessous.

→ Personnes-contacts

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)

²⁶ QSAR Prediction Reporting Format

²⁷ QSAR Model Reporting Format