

PROJET  
FINAL

NORME  
INTERNATIONALE

ISO/FDIS  
10993-10

ISO/TC 194

Secrétariat: DIN

Début de vote:  
2021-06-17

Vote clos le:  
2021-08-12

---

---

## Évaluation biologique des dispositifs médicaux —

### Partie 10: Essais de sensibilisation cutanée

*Biological evaluation of medical devices —*

*Part 10: Tests for skin sensitization*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/FDIS 10993-10

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10>

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

**TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN**



Numéro de référence  
ISO/FDIS 10993-10:2021(F)

© ISO 2021

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO/FDIS 10993-10](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10)  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +41 22 749 01 11  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Principes généraux — Approche par étapes</b> .....	<b>3</b>
<b>5 Considérations préalables aux essais</b> .....	<b>4</b>
5.1 Généralités.....	4
5.2 Types de matériaux.....	4
5.2.1 Considérations préliminaires.....	4
5.2.2 Céramiques, métaux et alliages.....	4
5.2.3 Polymères.....	4
5.2.4 Matériaux d'origine biologique.....	5
5.3 Informations sur la composition chimique.....	5
5.3.1 Généralités.....	5
5.3.2 Sources de données existantes.....	5
<b>6 Essais de sensibilisation cutanée</b> .....	<b>5</b>
6.1 Choix des méthodes d'essai.....	5
6.2 Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques chez la souris.....	6
6.2.1 Principe.....	6
6.2.2 Préparation des échantillons pour essai.....	6
6.2.3 Animaux et leur hébergement.....	7
6.2.4 Mode opératoire d'essai.....	7
6.2.5 Groupes de traitement.....	8
6.2.6 Détermination de la prolifération cellulaire et préparation des tissus.....	9
6.2.7 Résultats et interprétation.....	9
6.2.8 Rapport d'essai.....	10
6.3 Essais sur cobaye pour la détection d'une sensibilisation cutanée.....	10
6.3.1 Principe.....	10
6.3.2 Choix des concentrations du matériau d'essai.....	10
6.3.3 Induction.....	10
6.3.4 Application déclenchante.....	10
6.4 Facteurs importants permettant d'influencer le résultat de l'essai.....	11
6.5 Essai de maximalisation sur cobaye.....	12
6.5.1 Principe.....	12
6.5.2 Préparation des échantillons pour essai.....	12
6.5.3 Animaux et leur hébergement.....	12
6.5.4 Mode opératoire d'essai.....	12
6.5.5 Observation des animaux.....	15
6.5.6 Évaluation des résultats.....	15
6.5.7 Rapport d'essai.....	16
6.6 Essai épicutané occlusif (Essai de Buehler).....	16
6.6.1 Principe.....	16
6.6.2 Préparation des échantillons pour essai.....	16
6.6.3 Animaux et leur hébergement.....	16
6.6.4 Mode opératoire d'essai.....	17
6.6.5 Observation des animaux.....	18
6.6.6 Évaluation des résultats.....	18
6.6.7 Rapport d'essai.....	18
<b>7 Facteurs clés pour l'interprétation des résultats d'essai</b> .....	<b>19</b>
<b>Annexe A (normative) Préparation des matériaux pour les essais de sensibilisation</b> .....	<b>20</b>

<b>Annexe B (informative) Méthode de préparation d'extraits à partir de matériaux d'essai polymériques</b> .....	<b>22</b>
<b>Annexe C (informative) Méthodes non-animales pour la sensibilisation cutanée</b> .....	<b>25</b>
<b>Annexe D (informative) Informations générales</b> .....	<b>39</b>
<b>Annexe ZA (informative) Relation entre la présente Norme européenne et les exigences essentielles concernées de la Directive 93/42/CEE [JO L 169]</b> .....	<b>42</b>
<b>Annexe ZB (informative) Relation entre la présente Norme européenne et les exigences essentielles concernées de la Directive 90/385/CEE [JO L 189]</b> .....	<b>44</b>
<b>Annexe ZC (informative) Relation entre la présente Norme européenne et les exigences générales en matière de sécurité et de performances concernées du Règlement (UE) 2017/745</b> .....	<b>46</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>48</b>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO/FDIS 10993-10](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10>

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 194, *Évaluation biologique et clinique des dispositifs médicaux*, en collaboration avec le Comité Technique CEN/TC 206, *Évaluation biologique et clinique des dispositifs médicaux*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette quatrième édition annule et remplace la troisième édition (ISO 10993-10:2010), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- le présent document contient une description des essais de sensibilisation cutanée uniquement;
- l'[Annexe C](#) concernant les méthodes non-animales pour la sensibilisation cutanée (précédemment [Annexe D](#)) a été mise à jour;
- les essais d'irritation sont maintenant décrits dans l'ISO 10993-23.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 10993 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

## Introduction

Le présent document évalue les dangers éventuels dus au contact avec des produits chimiques libérés par des dispositifs médicaux pouvant provoquer une sensibilisation cutanée.

Certains matériaux contenus dans ces dispositifs médicaux ont fait l'objet d'essais, et le risque de sensibilisation cutanée qu'ils présentent a été documenté. Les propriétés de sensibilisation pour les matériaux dentaires en particulier ont été consignées, voir Référence [51]. D'autres matériaux et leurs constituants chimiques n'ont pas fait l'objet d'essais et peuvent induire des effets indésirables lorsqu'ils sont en contact avec des tissus humains. Le fabricant est donc tenu d'évaluer les effets indésirables potentiels de chaque dispositif avant de le commercialiser.

Traditionnellement, des essais sur les petits animaux sont effectués avant les essais sur l'être humain afin d'aider à prévoir la réaction chez l'homme (des informations contextuelles sont fournies à l'Annexe D). Depuis 2015, plusieurs essais *in chemico* et *in vitro* ont été validés, et des lignes directrices d'essai de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) ont été publiées pour évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques[75][79][104]. Une vue d'ensemble des essais alternatifs disponibles de sensibilisation pour les produits chimiques purs est présentée dans l'Annexe C. Ces méthodes d'essai, chacune élaborée pour répondre à un événement clé particulier, peuvent ne pas être suffisantes à elles seules pour déterminer la présence ou l'absence de potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques, et il convient qu'elles soient considérées dans un contexte d'approches intégrées, telles que les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (IATA, integrated approach to testing and assessment), en les associant à des informations complémentaires. Il est à noter que les essais *in vitro* et *in chemico* pour la sensibilisation cutanée (voir Annexe C) ont jusqu'ici été validés uniquement pour des produits chimiques purs et non pour des dispositifs médicaux. Afin d'appliquer ces essais à la détermination du potentiel de sensibilisation cutanée des dispositifs médicaux, leur applicabilité doit être vérifiée.

Le cas échéant, le recours préliminaire à des méthodes *in vitro* est encouragé dans le but d'orienter préalablement les essais sur les animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le présent document utilise une approche par étapes avec examen et analyse des résultats d'essais à chaque stade. Il est prévu que, pour les soumissions aux autorités réglementaires, les études de sensibilisation soient menées conformément aux principes des BPL ou de l'ISO/IEC 17025 selon les règles applicables au pays concerné, et qu'elles soient conformes aux réglementations relatives à la protection des animaux. L'analyse statistique de données est recommandée et doit être utilisée chaque fois que cela s'avère nécessaire. Le présent document est destiné à être utilisé par les professionnels, qualifiés par une formation et une expérience appropriées, capables d'interpréter ses exigences et de juger des conclusions de l'évaluation pour chaque dispositif médical, en tenant compte de tous les facteurs concernant le dispositif, son emploi prévu et les connaissances en cours sur le dispositif médical apportées par la consultation de la littérature scientifique et des expériences cliniques antérieures.

Les essais inclus dans le présent document constituent des outils importants pour la mise au point de produits sûrs, à condition qu'ils soient réalisés et interprétés par un personnel qualifié.

Le présent document est fondé sur de nombreuses normes et directives, y compris les lignes directrices de l'OCDE, la pharmacopée des États-Unis et la pharmacopée européenne. Il vise à constituer le document de référence de base pour la sélection et la conduite des essais permettant d'évaluer les réactions de sensibilisation dermique se rapportant à la sécurité des matériaux et des dispositifs médicaux.

# Évaluation biologique des dispositifs médicaux —

## Partie 10: Essais de sensibilisation cutanée

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie le mode opératoire pour l'évaluation du potentiel des dispositifs médicaux et de leurs matériaux constitutifs à provoquer une sensibilisation cutanée.

Le présent document comprend:

- des informations détaillées relatives aux modes opératoires d'essai de sensibilisation *in vivo*;
- les facteurs clés pour l'interprétation des résultats.

NOTE Des instructions pour la préparation des matériaux spécifiquement pour les essais ci-dessus sont données dans l'[Annexe A](#).

### 2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 10993-1:2018, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 1: Évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque*

ISO 10993-2, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 2: Exigences relatives à la protection des animaux*

ISO 10993-12, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 12: Préparation des échantillons et matériaux de référence*

ISO 10993-18, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 18: Caractérisation chimique des matériaux des dispositifs médicaux au sein d'un processus de gestion du risque*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions de l'ISO 10993-1 ainsi que les suivants, s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>.

**3.1 allergène**  
sensibilisant  
substance ou matériau capable d'induire une réaction d'hypersensibilité spécifique lors d'un contact répété avec cette substance/ce matériau

**3.2 dermatite allergique de contact**  
diagnostic clinique fondé sur l'observation d'une réaction cutanée à médiation immunitaire à une substance

**3.3 blanc**  
*véhicule* (3.17) d'extraction ne contenant pas le *matériau d'essai* (3.15), contenu dans un récipient identique à celui contenant le matériau d'essai et soumis à des conditions identiques à celles auxquelles est soumis le matériau d'essai au cours de son extraction

Note 1 à l'article: Le but du témoin blanc est d'évaluer les interférences possibles liées au récipient d'extraction, au véhicule et au processus d'extraction.

**3.4 application déclenchante**  
processus suivant la phase d'*induction* (3.8) au cours de laquelle on évalue les réponses immunologiques d'un individu résultant d'expositions répétées au matériau inducteur

**3.5 élicitation**  
réaction immunitaire suite à l'exposition à un sensibilisant chez une personne préalablement sensibilisée

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

**3.6 érythème**  
rougissement de la peau ou d'une muqueuse

[ISO/FDIS 10993-10](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10>

**3.7 extrait**  
liquide résultant de l'extraction de l'*échantillon* (3.16) ou du témoin soumis à essai

[SOURCE: ISO 10993-12:2012]

**3.8 induction**  
processus aboutissant à la génération *de novo* d'une réactivité accrue de la réponse immunitaire d'un individu à un matériau spécifique après une exposition initiale

**3.9 irritant**  
agent provoquant une *irritation* (3.10)

**3.10 irritation**  
réaction inflammatoire non spécifique localisée à une application unique, répétée ou continue d'une substance/d'un matériau

Note 1 à l'article: L'irritation de la peau est une réaction réversible et se caractérise principalement par des symptômes comme un *érythème* (3.6) local (rougeur), gonflement, démangeaison, pelage, craquelure et squame de la peau.

**3.11****témoin négatif**

matériau et/ou substance bien caractérisés qui, lors d'essais réalisés selon un mode opératoire spécifique, démontrent l'aptitude du mode opératoire à fournir une réponse négative reproductible, non réactive ou minimale lors de l'expérimentation

Note 1 à l'article: Dans la pratique, les témoins négatifs comprennent les *blancs* (3.3), les *véhicules* (3.17)/solvants et les produits de référence.

[SOURCE: ISO 10993-12:2012 — modifiée — La Note 1 à l'article a été ajoutée.]

**3.12****œdème**

gonflement dû à l'infiltration anormale de fluide dans les tissus

**3.13****témoin positif**

matériau et/ou substance bien caractérisés qui, lors d'essais réalisés selon un mode opératoire spécifique, démontrent l'aptitude du système à fournir une réponse positive reproductible ou réactive lors de l'expérimentation

**3.14****sensibilisation cutanée**

réaction d'hypersensibilité retardée véhiculée par les lymphocytes T, induite par des substances chimiques de faible poids moléculaire (allergènes). Elle comprend deux phases: l'induction et l'élicitation

Note 1 à l'article: Chez l'homme, les réactions peuvent être caractérisées par un prurit, un *érythème* (3.6), un *œdème* (3.12), des papules, des vésicules, des bulles ou une combinaison de ceux-ci. Pour d'autres espèces, les réactions peuvent être différentes et seuls l'érythème et l'œdème peuvent être visibles.

**3.15****matériau d'essai**

matériau, dispositif, partie ou composant de dispositif qui est échantillonné pour la conduite d'essais biologiques ou chimiques

**3.16****échantillon d'essai**

matériau, dispositif, partie de dispositif, composant, *extrait* (3.7) ou partie de celui-ci qui est soumis à des essais biologiques ou chimiques ou à une évaluation

**3.17****véhicule**

liquide utilisé pour humidifier, diluer, mettre en suspension, extraire ou dissoudre le matériau/la substance d'essai

**4 Principes généraux — Approche par étapes**

Les méthodes de détermination de la sensibilisation ont été développées spécialement pour détecter le potentiel de sensibilisation cutanée. Ces essais ne permettent généralement pas de prédire les autres types d'effets indésirables.

Le présent document requiert une approche par étapes, considérant que toute étape peut aboutir à la conclusion que des essais supplémentaires de sensibilisation cutanée ne sont pas nécessaires:

- a) revue de la littérature et des informations du fournisseur, y compris les caractéristiques chimiques et physiques, et les informations relatives au potentiel de sensibilisation de tout composant d'un dispositif médical ainsi que des produits chimiques et des matériaux de structure apparentée; se référer à l'ISO 10993-1 pour plus de détails. Effectuer une évaluation des risques sur la base des informations existantes afin de déterminer si le risque de sensibilisation est acceptable ou si des essais supplémentaires sont nécessaires;

- b) le cas échéant, caractérisation supplémentaire et évaluation des risques du matériau du dispositif, impliquant une caractérisation chimique et une analyse de l'échantillon d'essai selon les principes généraux décrits dans l'ISO 10993-18;
- c) conformément à l'ISO 10993-2, des essais *in vitro* doivent être envisagés de préférence aux essais *in vivo* et ces derniers doivent être remplacés chaque fois que de nouveaux essais *in vitro* sont validés scientifiquement et deviennent raisonnablement et pratiquement disponibles;

NOTE Il existe actuellement plusieurs essais *in vitro* validés et acceptés à l'échelle internationale permettant de détecter le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques; toutefois, ces essais *in vitro* n'ont encore été validés pour des dispositifs médicaux. Des travaux sont actuellement menés pour certains de ces essais en vue de les qualifier [SE031] pour une utilisation avec des dispositifs médicaux;

- d) les essais *in vivo* sur l'animal sont appropriés uniquement lorsque les matériaux d'essai ne peuvent pas être caractérisés et les évaluations du risque ne peuvent pas être entreprises en utilisant les informations obtenues par les moyens indiqués en a), b) et c).

## 5 Considérations préalables aux essais

### 5.1 Généralités

Il est important de souligner que les considérations préalables aux essais peuvent amener à conclure que les essais de sensibilisation ne sont pas nécessaires.

Les exigences données dans l'ISO 10993-1:2018, Article 5, et les exigences suivantes s'appliquent.

Les échantillons *in vivo* non stériles doivent être examinés par une investigation topique uniquement, car la possibilité d'une contamination microbienne de l'échantillon d'essai est susceptible de nuire à l'interprétation finale des essais. Lorsque la stérilité d'un échantillon d'essai ne peut être garantie alors que l'échantillon est encore considéré comme exempt de contamination microbienne, l'administration intradermique peut être justifiée.

### 5.2 Types de matériaux

#### 5.2.1 Considérations préliminaires

Il doit être pris en considération que, pendant la fabrication et l'assemblage des dispositifs médicaux, des composants chimiques supplémentaires peuvent être utilisés comme intermédiaires de fabrication, par exemple des lubrifiants ou des agents de démoulage. En plus des composants chimiques du matériau initial et des intermédiaires de fabrication, des résidus d'adhésif/de solvant provenant de l'assemblage et également des résidus de stérilisation ou des produits résultant de réactions lors du procédé de stérilisation peuvent être présents dans un produit fini. Le risque que constituent ces composants pour la santé dépend des caractéristiques de relargage ou de dégradation des produits finis. Ces composants chimiques qui présentent un potentiel de sensibilisation cutanée doivent être identifiés.

#### 5.2.2 Céramiques, métaux et alliages

Ces matériaux sont normalement moins complexes que les polymères et les matériaux d'origine biologique en termes de nombre de composants chimiques.

#### 5.2.3 Polymères

La composition chimique de ces matériaux est d'ordinaire plus complexe que ceux décrits en 5.2.2. Un certain nombre de produits réactionnels/impuretés/additifs/catalyseurs résiduels peuvent être présents et le degré ou l'étendue de la polymérisation peut varier.

## 5.2.4 Matériaux d'origine biologique

Ces matériaux ont par essence une composition complexe. Ils contiennent souvent des résidus de procédé, par exemple des agents de réticulation et des agents antimicrobiens. Les matériaux d'origine biologique peuvent varier d'un échantillon à l'autre.

Les méthodes du présent document n'ont pas été conçues pour des essais sur des matériaux d'origine biologique et peuvent donc être inappropriées. Par exemple, les essais du présent document ne prennent pas en considération la sensibilisation inter-espèces.

## 5.3 Informations sur la composition chimique

### 5.3.1 Généralités

Des données qualitatives complètes sur les composants chimiques du matériau doivent être établies. Des données quantitatives sur la composition chimique doivent également être obtenues. Si des données quantitatives ne sont pas obtenues, la justification doit être documentée et établie.

### 5.3.2 Sources de données existantes

Lorsque cela est possible, les informations relatives à la composition qualitative et quantitative doivent être obtenues auprès du fournisseur du matériau d'origine.

Pour les polymères, cette étape requiert souvent l'accès à des informations confidentielles et il convient de prendre des mesures appropriées pour le transfert et l'utilisation de telles informations.

Les informations qualitatives sur les additifs de fabrication supplémentaires (par exemple les produits de démoulage) doivent également être obtenues auprès des acteurs appropriés de la chaîne de fabrication, incluant les transformateurs et les fabricants de composants.

Si les informations relatives à la composition sont incomplètes, une étude documentaire est recommandée pour établir la nature probable du matériau de départ et de tout additif afin d'aider au choix des méthodes d'analyse les plus appropriées pour le matériau concerné.

La composition chimique des produits finalisés doit être déterminée conformément à l'ISO 10993-18.

**NOTE** La composition des céramiques, des métaux et des alliages peut être spécifiée conformément à des normes internes de l'ISO ou de l'ASTM et/ou peut être spécifiée par l'utilisateur. Toutefois, afin d'obtenir des détails complets sur la composition qualitative et quantitative, il peut être nécessaire de les demander au fournisseur ou au fabricant du matériau de départ ainsi qu'aux fabricants de composants afin de s'assurer que les intermédiaires de fabrication sont également identifiés. S'ils sont accessibles, les fichiers sur le matériau détenus par les autorités réglementaires représentent une autre source de données.

## 6 Essais de sensibilisation cutanée

### 6.1 Choix des méthodes d'essai

Les approches alternatives *in vitro et in chemico* ont été développées pour des produits chimiques purs basées sur une combinaison de différents essais afin d'identifier un sensibilisant cutané. Plusieurs de ces méthodes ont été incluses dans les lignes directrices d'essai de l'OCDE (TG 442C<sup>[75]</sup>, TG 442D<sup>[79]</sup> et TG 442E<sup>[104]</sup>) ou dans le programme de lignes directrices d'essais de l'OCDE<sup>[121]</sup> (voir [Annexe C](#)).

Ensemble, les essais décrits dans ces lignes directrices d'essai couvrent trois événements clés de l'Adverse Outcome Pathway (AOP) à présent identifiés pour la sensibilisation, y compris l'événement initiateur moléculaire (liaison protéinique), l'induction de l'inflammation et l'activation des cellules dendritiques. Ces méthodes d'essai, élaborées pour faire face à un événement clé particulier, peuvent ne pas être suffisantes à elles-seules pour déterminer la présence ou l'absence de potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques, et il convient qu'elles soient considérées dans un contexte d'approches intégrées, telles que l'IATA, en les associant à des informations complémentaires.

Conformément à l'ISO 10993-2, ces approches intégrées doivent être prises en considération lors de l'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques purs. On ignore encore si ces approches sont également applicables aux dispositifs médicaux ou aux extraits de dispositifs médicaux. Une vue d'ensemble des essais alternatifs disponibles de sensibilisation pour les produits chimiques purs est présentée dans l'[Annexe C](#).

Il existe actuellement trois essais sur les animaux pour déterminer le risque de sensibilisation cutanée par les produits chimiques. Il s'agit de deux essais chez le cobaye et d'un essai chez la souris. Les deux essais chez le cobaye sont l'essai de maximalisation sur le cobaye (GPMT, guinea pig maximization test) et l'essai avec système occlusif (essai de Buehler). Sur ces deux essais, l'essai de maximalisation est la méthode la plus sensible. Voir référence [9]. L'essai avec système occlusif convient aux produits topiques.

L'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques chez la souris (LLNA) a été internationalement accepté en tant que ligne directrice d'essai de l'OCDE en 2010<sup>[33]</sup> pour tester des produits chimiques simples en remplacement des méthodes d'essais sur les cobayes; il est actuellement l'essai *in vivo* préféré pour les produits chimiques. Voir Références [19] et [32]. Dans certains cas, les essais sur cobaye peuvent être nécessaires pour évaluer le potentiel de sensibilisation de certains échantillons d'essai. Il pourrait en être ainsi dans le cas de certains métaux (voir Référence [44]) qui peuvent donner des résultats faux-négatifs dans le LLNA ou des irritants de la peau qui peuvent donner des résultats faux-positifs, ainsi que pour des substances de poids moléculaire élevé qui ne pénètrent pas dans la peau, ou des substances non solubles dans les véhicules recommandés.

NOTE Les trois essais sur les animaux ont tous été mis au point pour la détection du potentiel de sensibilisation cutanée par des produits chimiques, c'est-à-dire dermatite par contact, hypersensibilité retardée (type IV).

Eu égard aux dispositions de l'ISO 10993-2 sur les exigences relatives à la protection des animaux, lorsqu'un essai *in vivo* est réalisé, le LLNA doit être envisagé. En plus des considérations relatives à la protection des animaux, le LLNA a l'avantage de fournir des données quantitatives objectives.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac->

## 6.2 Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques chez la souris

### 6.2.1 Principe

À la suite de l'application topique d'un échantillon d'essai sur le dos des oreilles, on mesure le niveau de la prolifération des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques qui drainent les sites d'application (oreilles). Pour déclarer un matériau d'essai comme étant un sensibilisant, le seuil est une réponse en prolifération cellulaire au moins égale au triple de celle correspondant à l'activité des témoins.

Le LLNA doit être réalisé par une approche dose-réponse lorsque des substances sont utilisées. Pour les produits/dispositifs médicaux finaux, un essai sur l'extrait non dilué uniquement peut suffire.

NOTE Les références [15] à [44] contiennent des publications représentatives de LLNA. Les laboratoires menant cet essai sont invités à consulter ces publications et d'autres publications pertinentes disponibles.

### 6.2.2 Préparation des échantillons pour essai

L'échantillon d'essai doit être un liquide, une suspension, un gel ou une pâte pouvant être appliqué sur les oreilles des souris. Dans la mesure du possible, une série de doses (dilutions) doit être étudiée. Autrement, il convient d'utiliser la plus forte concentration préparée sous forme d'une solution ou suspension chimique ou sous forme d'extrait. Lorsqu'une réaction forte est détectée dans le LLNA avec un extrait, une étude complémentaire évaluant plusieurs doses peut être nécessaire pour évaluer la puissance de sensibilisation possible de l'extrait. La toxicité systémique et une irritation locale excessive de la peau pouvant invalider les résultats d'essai, il convient d'éviter ces réactions. Dans certaines circonstances, des essais préalables peuvent s'avérer nécessaires.

Un véhicule couramment utilisé pour les substances/produits chimiques est le mélange acétone-huile d'olive (AOO) 4:1. Il convient de modifier les échantillons liquides qui sont hydrophiles et/ou n'adhèrent pas correctement à la peau de l'oreille afin qu'ils adhèrent au site d'essai. Cela peut être obtenu en

ajoutant un épaississant comme la carboxyméthylcellulose ou l'hydroxyéthylcellulose (avec une densité de 0,5 %) ou avec un agent tensioactif comme le Pluronic® L92<sup>1</sup> avec une fraction volumique de 1 %. Pour les produits chimiques solubles dans l'eau, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le diméthylformamide (DMF) sont préférés à l'agent tensioactif Pluronic® L92<sup>1</sup>. Voir référence [34]. En alternative, d'autres véhicules d'extraction peuvent être utilisés, comme indiqué. Voir référence [33]. L'effet des ajouts aux milieux d'extraction et/ou des variations de composition du véhicule doit être validé et documenté. Cela peut être réalisé par des expérimentations sur des sensibilisants faibles à modérés tels qu'utilisés couramment comme témoin positif. De plus, l'enrichissement de l'échantillon d'essai avec un témoin positif pourrait être réalisé afin de démontrer que le LLNA reste capable de détecter la présence de sensibilisants potentiels dans l'extrait préparé. D'autres aspects fondamentaux de l'extraction d'articles d'essai sont spécifiés dans l'ISO 10993-12.

Un extrait distinct doit être préparé pour chaque application quotidienne.

NOTE Pour les matériaux polymères, une méthode d'extraction optionnelle est indiquée à l'Annexe B.

### 6.2.3 Animaux et leur hébergement

Des souris femelles saines et non gravides de la souche CBA/Ca, CBA/J ou BALB/c doivent être utilisées, à moins qu'une autre souche n'ait été validée. Voir Références [33], [41] et [42]. Plusieurs souches de souris ont été identifiées comme étant acceptables (DBA/2, B6C3F1). Voir référence [35]. Les souris doivent être âgées de 7 semaines à 12 semaines; les âges des souris dans chaque étude doivent être en correspondance (dans une plage d'âge d'une semaine).

L'hébergement et la sélection des animaux doivent être conformes à l'ISO 10993-2. Les souris, régulièrement acclimatées au laboratoire, doivent être identifiées individuellement. Pour certains échantillons d'essai, un logement individuel peut s'avérer nécessaire. Cela doit être justifié et documenté.

Les animaux doivent être identifiés de manière unique à l'aide de méthodes qui ne doivent pas inclure les étiquettes d'oreille ou les poinçons d'oreille.

En cas d'hébergement en groupe, il convient de prendre en considération la contamination croisée et la prise orale intempestive.

### 6.2.4 Mode opératoire d'essai

Pour les produits chimiques, le LLNA est en général réalisé par dose-réponse. Pour les dispositifs médicaux solides, les échantillons à soumettre à essai doivent être des extraits. Dans ce cas, une seule dose est disponible pour les essais. En général, l'extrait peut être étudié non dilué. Cependant, si l'extrait contient des composants hautement toxiques, cela peut conduire à une réaction négative dans l'essai LLNA en raison de la toxicité. Il est donc recommandé de réaliser le LLNA par dose-réponse et de diluer l'extrait lors de l'examen des extraits cytotoxiques (voir l'ISO 10993-5). En outre, quand une réaction forte est détectée dans le LLNA, un suivi de dose-réponse peut être effectué pour évaluer la puissance de sensibilisation possible de l'extrait.

Pour garantir la reproductibilité et la sensibilité, un essai de substance témoin positive pour la sensibilisation cutanée doit être inclus par le laboratoire d'essai afin de valider le système d'essai et de démontrer une réaction positive. Des allergènes par contact faibles à modérés bien connus, par exemple le mercaptobenzothiazole, l'aldéhyde cinnamique d'hexyle ou la benzocaïne, doivent être utilisés comme témoin positif. Les exemples mentionnés peuvent ne pas être adaptés à chaque véhicule utilisé pour la préparation de l'échantillon (par exemple véhicule aqueux); dans ce cas, un autre témoin positif pourrait être choisi. Selon l'ASTM F2148, dans ces circonstances, il convient que le formol et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) soient utilisés comme témoins positifs. Cela doit être justifié et documenté.

1) Pluronic® L92 est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'attention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné.

Même si l'inclusion d'un groupe de témoins positifs en simultané est recommandée, il peut y avoir des situations dans lesquelles seuls des essais périodiques (à savoir à des intervalles  $\leq 6$  mois) de la substance d'essai témoin positive peuvent être adéquats. C'est le cas pour des laboratoires qui réalisent les LLNA régulièrement (c'est-à-dire qui réalisent les LLNA à une fréquence qui ne soit pas inférieure à une fois par mois) et disposent d'une base de données historique établie sur témoin positif qui démontre la capacité du laboratoire à obtenir des résultats reproductibles et exacts avec des témoins positifs. Une maîtrise adéquate du LLNA peut être démontrée avec succès en générant des résultats positifs systématiques avec les témoins positifs lors d'au moins 10 essais indépendants effectués sur une période raisonnable (moins d'un an).

Le poids corporel de chaque individu doit être consigné au début et à la fin de l'étude. Afin de détecter la toxicité potentielle de l'échantillon d'essai, une observation clinique doit être menée et enregistrée au cours de l'étude.

Lorsqu'un témoin positif n'est utilisé qu'une fois tous les six mois, si celui-ci présente un résultat négatif, cela peut avoir des conséquences sur les résultats obtenus au cours de la période des six mois précédents. La référence [33] stipule que des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles  $\leq 6$  mois) de la substance témoin positive peuvent être envisagés dans les laboratoires réalisant régulièrement le LLNA (c'est-à-dire à une fréquence qui ne soit pas inférieure à une fois par mois) et disposant d'un historique et d'une maîtrise documentée, afin d'obtenir des résultats cohérents avec les témoins positifs. Il est important de réaliser que la décision d'inclure un témoin positif périodiquement, et pas simultanément, pourrait avoir une influence sur l'adéquation et l'acceptabilité des résultats d'étude négatifs générés sans témoin positif concomitant dans l'intervalle entre deux études périodiques du témoin positif. Par exemple, si un résultat faux négatif est obtenu au cours de l'essai périodique du témoin positif, tous les résultats négatifs obtenus pour la substance d'essai dans l'intervalle entre le dernier essai périodique acceptable du témoin positif et l'essai périodique inacceptable du témoin positif pourraient être douteux. Pour démontrer que les résultats négatifs précédents pour la substance d'essai sont acceptables, un laboratoire pourrait être contraint de répéter tous les résultats négatifs, ce qui aurait pour conséquence d'accroître les dépenses et l'utilisation d'animaux.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c982269a-3558-43e0-b2ac-b5bcc1f412a3/iso-fdis-10993-10>

### 6.2.5 Groupes de traitement

Lorsqu'un LLNA est réalisé, les données relatives à un minimum de cinq souris par groupe doivent être disponibles pour l'évaluation. Les réactions des ganglions lymphatiques peuvent être déterminées par mesure individuelle ou par mesure d'échantillons des ganglions lymphatiques regroupés. Pour l'analyse statistique, la mesure individuelle est préférable.

Lorsqu'une seule dose est disponible pour l'évaluation, par exemple un extrait, un minimum de cinq souris doit être utilisé pour chaque groupe, si les mesures portent sur des réponses individuelles.

Les groupes de traitement doivent être assignés à:

- un blanc de chaque type de véhicule utilisé (voir [Annexe A](#));
- le cas échéant, un témoin positif pour chaque véhicule utilisé;
- des groupes d'essai pour chaque véhicule d'extraction utilisé.

Lorsqu'un produit chimique ou une substance simple est soumis(e) à essai, le LLNA doit être réalisé par dose-réponse. Pour tous les autres types d'échantillons d'essai comme les extraits, une évaluation par dose-réponse peut ne pas s'avérer réalisable. Si un seul groupe d'essai est utilisé, cela doit être justifié et documenté.

NOTE Lorsque des données suffisantes ont été recueillies pour démontrer la cohérence de la dose-réponse du témoin positif, une dose unique pourrait être incluse pour démontrer la sensibilité de l'essai. Voir référence [32].

L'échantillon approprié doit être appliqué sur la face dorsale des deux oreilles des souris désignées à une dose de 25  $\mu$ l par jour pendant trois jours consécutifs. Observer chaque jour les oreilles en vue de déceler des signes d'irritation qui pourraient perturber l'interprétation des résultats. Voir Références [23], [27] et [29].

### 6.2.6 Détermination de la prolifération cellulaire et préparation des tissus

Les cellules proliférantes dans les ganglions lymphatiques drainants peuvent être marquées par un marqueur radioactif ou fluorescent. Les radio-marqueurs communément utilisés sont la méthylthymidine-<sup>3</sup>H et l'iododésoxyuridine-<sup>125</sup>I, alors que pour la fluorescence, la fluorodésoxyuridine pourrait être utilisée.

(72 ± 2) h après le dernier traitement, consigner le poids de chaque souris et administrer par intraveineuse le marqueur pour la prolifération des cellules. Injecter 0,25 ml de solution tamponnée aux phosphates (PBS) contenant 740 KBq (20 µCi) de méthylthymidine-<sup>3</sup>H dans toutes les souris d'essai et souris témoins via la veine caudale. Pour l'iododésoxyuridine-<sup>125</sup>I, injecter 0,25 ml de PBS contenant 74 KBq (2 µCi) et, pour la fluorodésoxyuridine, injecter 0,25 ml contenant 10<sup>-5</sup> mol/l dans la veine caudale. Voir référence [33].

D'autres variantes du mode opératoire ne nécessitant pas de radiomarquage sont disponibles et il convient de les prendre en considération [par exemple, mesure de l'adénosine triphosphate (ATP) (OCDE TG 442A [122]) (méthode DA), mesure de la bromodésoxyuridine, BrdU (OCDE TG 442B [123]) (méthode ELISA ou FCM)].

NOTE 1 Pour plus d'informations, voir Références [33], [36], [42], [43] et [49].

Euthanasier les souris (5 ± 0,75) h après l'administration de la solution de marquage conformément à l'ISO 10993-2. Retirer le ganglion lymphatique auriculaire drainant. Il faut prendre soin d'éviter toute contamination croisée des échantillons de tissus. Les ganglions lymphatiques de chaque groupe peuvent être regroupés ou bien des paires de ganglions lymphatiques de chaque animal peuvent être regroupées. Il est préférable d'obtenir les données pour chaque animal afin de déterminer la variabilité entre les animaux d'un groupe. Les préparations cellulaires sont obtenues en pressant doucement les ganglions lymphatiques à travers une toile d'acier inoxydable ou de nylon de 200 µm par-dessus un récipient. Rincer le filtre en versant du PBS refroidi dans le récipient pour éliminer les cellules du filtre. Le récipient contient maintenant la préparation de cellules. Les préparations de cellules sont lavées deux fois par centrifugation et remises en suspension dans une PBS. Les cellules sont précipitées avec de l'acide trichloracétique (TCA) à 5 % à une température de (4 ± 2) °C pendant (18 ± 1) h. Après une étape de centrifugation finale, les culots sont remis en suspension dans 1 ml de TCA puis transférés dans des fioles de scintillation contenant 10 ml de fluide de scintillation en vue du comptage du tritium (<sup>3</sup>H) ou transférés directement dans un compteur gamma pour le comptage du <sup>125</sup>I. Voir Références [21], [35] et [36].

NOTE 2 Alternativement, le marquage et la détermination de la prolifération cellulaire peuvent aussi être réalisés *ex vivo*. Voir Références [37] et [38].

### 6.2.7 Résultats et interprétation

Mesurer le niveau de radioactivité dans les cellules de ganglions lymphatiques en coups par minute par souris (cpm/souris). Convertir les coups par minute (cpm) en désintégration par minute (dpm). Calculer la moyenne et l'écart-type des dpm pour au moins trois coups pour chaque animal ou chaque groupe de souris. Soustraire la valeur du bruit de fond de chaque résultat.

Si l'on utilise la méthode d'échantillonnage individuel, continuer à calculer la moyenne et l'écart-type des dpm pour chaque groupe de cinq souris. Déterminer l'Indice de Stimulation (SI) en divisant le dpm moyen de l'essai par le dpm du blanc. Une valeur du SI supérieure ou égale à trois (≥3,0) doit être considérée positive pour désigner un échantillon d'essai comme étant un sensibilisant. Voir référence [16].

Les échantillons témoins positifs doivent produire un SI supérieur ou égal à 3,0.

Pour qu'une étude soit valide, l'essai du témoin positif doit être mené soit simultanément, soit dans les six mois précédents. Voir référence [33].