



**Section 4**  
**Effets sur la santé**

## **Ligne directrice n° 494**

Méthode d'Essai Vitrigel Pour L'identification  
De Produits Chimiques Ne Nécessitant  
Aucune Classification Ni Étiquetage  
Pour Irritation Oculaire Ou Lésions  
Oculaires Graves

14 juin 2021

**Lignes directrices de l'OCDE pour  
les essais de produits chimiques**



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

### Méthode d'Essai Vitrigel Pour L'identification De Produits Chimiques Ne Nécessitant Aucune Classification Ni Étiquetage Pour Irritation Oculaire Ou Lésions Oculaires Graves

#### INTRODUCTION

1. Une lésion oculaire grave est une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique ou d'un mélange sur l'œil, et qui n'est pas totalement réversible, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1). Toujours selon le SGH de l'ONU, une irritation oculaire est définie comme la production de changements dans l'œil, totalement réversibles, suite à l'application d'un produit chimique ou d'un mélange sur l'œil. Les produits chimiques testés provoquant des lésions oculaires graves sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU, tandis que ceux provoquant une irritation oculaire sont classés dans la catégorie 2, elle-même subdivisée en catégories 2A et 2B. Les produits chimiques testés ne relevant ni de la catégorie 1, ni de la catégorie 2 ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou pour lésions oculaires graves ; ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU (« Sans catégorie »).

2. Jusqu'à présent, l'évaluation des lésions oculaires graves et de l'irritation oculaire impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire, tel que décrit dans la Ligne directrice de l'OCDE n° 405 (LD 405) (adoptée en 1981 et révisée en de nombreuses occasions) (2). Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette Ligne directrice doivent être envisagés dans le contexte du Document d'orientation de l'OCDE No. 263 relatif aux Approches intégrées sur les essais et l'évaluation (IATA) pour les lésions oculaires graves et l'irritation oculaire (3). Cependant, cette méthode ne traite pas des aspects de toxicité et de réversibilité de la toxicité oculaire. Toutefois au moment de choisir la combinaison d'essais utilisée à des fins de classification, il convient de tenir compte de tous les mécanismes de toxicité oculaire possibles et pertinents pour un produit chimique testé donné, en fonction des données et connaissances existantes, tel que décrit dans la LD 263 (2).

3. Le test d'irritation oculaire (TIO) Vitrigel® est une méthode *in vitro* permettant d'identifier, sans essais supplémentaires, des produits chimiques testés ne nécessitant ni

classification ni étiquetage pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves (« Sans catégorie » selon le SGH de l'ONU (1)) (4)(5)(6), et donc le TIO Vitrigel est une méthode qui suit une approche « bottom-up », tel que proposé par Scott *et al* (7). En revanche, le TIO Vitrigel® n'est pas destiné à identifier ni à différencier les produits chimiques relevant des catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU. Cette distinction doit être faite à une autre étape d'une stratégie par niveaux (3).

4. La présente Ligne directrice se fonde sur un protocole mis au point par Yamaguchi et Takezawa (8) et soumis à une étude de validation par une équipe de gestion de la validation constituée par le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM) en collaboration avec la Collaboration internationale pour les méthodes d'essai alternatives (*International Collaboration on Alternative Test Methods – ICATM*) (9). L'étude de validation a été menée par trois laboratoires japonais. Le rapport de validation a été évalué par un comité de pairs indépendant composé d'experts du monde entier (10). De plus, le groupe d'experts de l'OCDE a établi que le TIO Vitrigel® est une méthode valide pouvant être utilisée en première étape dans une approche « bottom-up » pour l'identification de produits chimiques testés ne nécessitant aucune classification ni étiquetage pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU).

5. L'objectif de la présente Ligne directrice est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire que présente un produit chimique testé en se fondant sur sa capacité à réduire la fonction de barrière de modèles d'épithélium cornéen humain (ECh) utilisés dans le TIO Vitrigel®. Les méthodes d'essai *in vitro* actuelles utilisent comme effets mesurés la viabilité de cellules cultivées *in vitro* ou l'opacité cornéenne de globes oculaires isolés *ex vivo*. Il est connu que les produits chimiques irritants pour l'œil détruisent d'abord le film lacrymal et la fonction de barrière de l'épithélium cornéen, avant d'induire la mort des cellules épithéliales et, enfin, une dégénérescence du stroma et la mort des cellules endothéliales, ce qui provoque une opacité cornéenne (11, 12). Pour cette raison, les changements de la fonction de barrière de l'épithélium constituent un effet mesuré pertinent pour détecter l'irritation oculaire (13, 14). Dans le test d'irritation oculaire Vitrigel, les changements dans le temps de la valeur de la résistance électrique transépithéliale (*Transsepithelial Electrical Resistance – TEER*) révèlent une perte de la fonction de barrière de l'épithélium cornéen suite à l'exposition à un produit chimique testé. Cette situation s'apparente aux lésions observées sur la cornée de lapin après exposition à un produit chimique testé et qui constituent un mode d'action important dans le processus de lésion de l'épithélium cornéen et d'irritation oculaire (4, 13).

6. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est soumis à l'essai et ne fait pas référence à l'applicabilité du TIO Vitrigel® pour les essais sur des substances et/ou mélanges. Le terme « préparation du produit chimique testé » est utilisé pour désigner le mélange entre le produit chimique et le milieu de culture (voir paragraphe 27).

7. Les définitions des termes utilisés sont données à l'Annexe 1.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Le TIO Vitrigel® est une méthode d'essai *in vitro* qui exploite des modèles d'épithélium cornéen humain (ECh) reconstitués dans une chambre contenant une matrice en vitrigel® de collagène (*collagen vitrigel membrane – CVM*) (5). Le potentiel d'irritation oculaire du produit chimique testé est prédit grâce à l'analyse des changements dans le temps de la valeur de la TEER, sur la base des scores de trois indices (voir le modèle prédictif au Tableau 2).

9. Le TIO Vitrigel® exploite comme effet mesuré la capacité destructrice du produit chimique testé sur la fonction de barrière d'un modèle d'ECh. Le produit chimique testé est dissous ou mis en suspension dans le milieu de culture avant l'exposition du modèle ECh pour éviter un

retard de la réaction dû à une dissolution lente. Dans une étude précédente il a été observé que les valeurs de TEER des modèles ECh diminuent immédiatement après l'exposition à la préparation de produit chimique testé et se stabilisent en 3 minutes (4). Ainsi, la période d'exposition du modèle d'ECh à la préparation de produit chimique a été imitée à 3 minutes.

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

10. Le TIO Vitrigel® s'applique aux produits chimiques qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le colorant formazan, ainsi qu'à ceux pouvant directement réduire le colorant tétrazolium (voir Paragraphe 16). En revanche, les préparations de produits chimiques solides et les produits chimiques acides ( $\text{pH} \leq 5$ ) et ayant une phase de séparation rapide ne sont pas dans le domaine d'application de la méthode telle que décrite ci-dessous. Quand la différence absolue des valeurs d'absorbance des préparations de produit chimique de 2.5% de masse/volume (m/v) à 0 et 3 minutes est supérieure à 0.1, le produit chimique ne doit pas être testé (voir paragraphe 28 pour plus de détails).

11. Les résultats de l'étude de validation ont démontré que le taux de reproductibilité entre laboratoires était de 80-100 % dans chacun des trois laboratoires, et de 92 % au sein des laboratoires. La capacité de prédiction de l'essai a été évaluée sur la base de données de validation et de données internes des concepteurs, pour 93 produits chimiques (9)(15)(16)(17). TIO Vitrigel® a présenté une sensibilité de 83 % (50/60), une spécificité de 70 % (23/33) et une précision de 78 % (73/93). L'essai tel que décrit dans ce paragraphe n'est pas la méthode de premier choix à cause de sa prédictivité limitée (c.à.dire sa faible spécificité).

12. L'analyse des réactions de faux-négatifs a indiqué que 5/10 produits chimiques ayant généré des faux négatifs étaient acides, et leurs préparations à 2,5 % m/v utilisées pour l'exposition présentaient un pH inférieur à cinq. En général, la TEER du modèle d'ECh après exposition aux produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'ONU restait presque inchangée comparé à la valeur de départ. La TEER du modèle d'ECh était plus élevée après exposition aux cinq produits chimiques testés acides ayant produit des faux négatifs, comme déjà rapporté (18, 19). Les solides non solubles dans l'eau, qui se séparent facilement du milieu de culture ont également tendance à générer des faux négatifs. Il convient de relever que les solides entraînent des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation de l'œil *in vivo* de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (2). La méthode TIO Vitrigel® peut être appliquée non seulement aux liquides mais aussi aux solides après avoir conduit un test préalable pour exclure les préparations de produit chimique solides ayant un  $\text{pH} \leq 5$  et/ou une phase de séparation rapide dans les 3 minutes que dure l'essai (voir paragraphe 28).

13. Prenant en compte ces considérations, 158 produits chimiques testés comprenant 94 liquides et 64 solides ont été testés. Parmi ceux-ci, 22 solides ont été exclus sur la base du test préalable évoqué ci-dessus : 7 solides avaient un  $\text{pH} \leq 5$  (dont 2 solides avaient aussi une phase de séparation rapide), et 15 solides avaient une phase de séparation rapide seulement ; 29 liquides ont été exclus : 5 liquides étaient acides (dont 2 avaient aussi une phase de séparation rapide) et 24 liquides avaient une phase de séparation rapide uniquement. Prenant en compte des exclusions, la sensibilité, la spécificité et l'exactitude de l'essai pour les 107 produits chimiques figurant dans le domaine d'application étaient de 96% (51/53), 67% (36/54) et 81% (87/107), respectivement. Le tableau 1 montre la capacité prédictive pour les produits solides et liquides séparément.

**Tableau 1. Capacité prédictive**

Liquides	Solides

Sensibilité 100% (34/34)	Sensibilité 89% (17/19)
Spécificité 71% (22/31)	Spécificité 61% (14/23)
Exactitude 86% (56/65)	Exactitude 74% (31/42)

Les deux produits chimiques faux négatifs (2/19) étaient en réalité des produits chimiques faiblement irritants (Catégorie 2B du SGH de l'ONU).

14. La méthode d'essai présente un pourcentage élevé de faux positifs. Les taux de faux positifs observés avec la méthode du TIO Vitrigel® ne sont pas critiques dans le contexte de la présente Ligne directrice, car tous les produits chimiques testés pour lesquels « aucune prédiction définitive ne peut être faite » seront soumis à une recherche d'informations ou à des essais supplémentaires, en fonction des exigences réglementaires et conformément au Document d'orientation de l'OCDE relatif aux IATA pour l'irritation oculaire et les lésions oculaires graves (3). Il y a lieu de consulter les autorités réglementaires compétentes avant de mettre en œuvre le TIO Vitrigel® dans un système de classification autre que le SGH de l'ONU.

15. Une limite de cette Ligne directrice est qu'elle ne permet pas de distinguer les produits chimiques produisant une irritation oculaire ou des effets réversibles sur l'œil (catégorie 2) de ceux entraînant des lésions oculaires graves ou des effets irréversibles sur l'œil (catégorie 1), ni les produits irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2A) de ceux modérément irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2B), tels que définis dans le SGH de l'ONU (1). Pour établir cette distinction, des essais supplémentaires avec d'autres méthodes d'essai *in vitro* sont nécessaires (3).

16. Techniquement, la présente Ligne directrice s'applique aux substances monoconstituants et multiconstituants liquides, aux substances à la composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou produits biologiques (UVCB). En revanche, les mélanges, gaz et aérosols n'ont pas été évalués dans l'étude de validation. Toutefois, avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques et substances difficiles à tester (parce qu'instables ou réactives dans l'eau par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables. Cette vérification n'est pas nécessaire lorsque les essais sur les mélanges sont exigés par la réglementation. Les produits chimiques testés qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le colorant formazan et ceux qui peuvent directement réduire le colorant tétrazolium (MTT) peuvent également être testés avec la méthode du TIO Vitrigel®.

17. Tout produit chimique testé entrant dans le domaine d'applicabilité détaillé ci-dessus selon le test préalable (c.-à-d., préparations de produit chimique de pH > 5 ne se séparant pas en deux phases dans les 3 minutes que dure l'essai) à 2,5 % (p/v) de concentration dans le milieu d'essai peut être soumis à la méthode du TIO Vitrigel®. Pour tester les produits chimiques difficilement solubles, on peut recourir à une ou plusieurs des méthodes suivantes : a) mélangeur vortex, b) sonication, c) chauffage à une température maximale de 70°C (voir le chapitre « Mode opératoire »).

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

18. Avant d'utiliser en routine la méthode du TIO Vitrigel décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les 10 substances recommandées à l'Annexe 2, Tableau 3. Ces substances ont été sélectionnées pour représenter l'ensemble de la gamme des réponses correspondant à des lésions

oculaires graves ou à une irritation oculaire, sur la base des résultats obtenus *in vivo* avec le test sur œil de lapin (LD 405) et du système de classification SGH de l'ONU (1). La disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et l'existence de données *in vitro* de bonne qualité issues de la méthode du TIO Vitrigel®, constituent d'autres critères de sélection (9)(10). Si une substance de la liste n'est pas disponible ou que sa non-utilisation peut être justifiée, elle est remplacée par une autre substance d'épreuve pour laquelle des données de référence *in vivo* et *in vitro* de bonne qualité sont disponibles.

## MODE OPÉRATOIRE

19. Les paragraphes qui suivent décrivent les principaux éléments et la procédure du TIO Vitrigel®, désigné ci-après comme Méthode de référence validée (MRV) (8). L'essai est mené conformément aux recommandations du Document d'orientation sur les bonnes pratiques applicables aux méthodes *in vitro* (20). Les nombres entiers fournis dans ce protocole sont réputés exacts à une décimale significative près. Par exemple, « 37°C » indique une plage d'acceptabilité comprise entre 36,5°C et 37,4°C.

### *Culture des cellules d'ECh*

20. Des cellules d'ECh immortalisées<sup>1</sup> sont conservées dans un milieu de culture contenant un mélange 1:1 de milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) et d'un mélange de nutriments F-12 enrichi avec 5 % de sérum de fœtus bovin (FBS) neutralisé à chaud, 5 µg/l d'insuline recombinante humaine, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique recombinant humain, 0,5 % de diméthylsulfoxyde, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont mises en culture à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque et mycosique, et les seules substances supplémentaires possibles sont les préparations de produits chimiques testés appliquées aux modèles d'ECh.

### *Préparation des chambres à CVM*

21. Installer une chambre contenant une matrice en xérogel de collagène (c.-à.-d. Vitrigel ad-MED, tel que dans la MRV<sup>2</sup>) dans le puits d'une plaque de culture à 12 puits et immerger la chambre dans le milieu de culture (1,5 ml à l'extérieur et 0,5 ml à l'intérieur de la chambre, dans le puits), puis attendre 10 minutes que le xérogel se transforme en vitrigel juste avant de l'utiliser. Si d'autres types de chambres sont utilisés, les modèles d'ECh préparés dans ces chambres doivent présenter une TEER adéquate.

### *Fabrication d'un modèle d'ECh*

#### *PROCÉDURE DE CULTURE*

22. Remplacer le milieu de culture à l'extérieur de la chambre installée dans un puits de la plaque à 12 puits par 1,5 ml de milieu de culture frais. Enlever délicatement le milieu de culture à l'intérieur de la chambre à l'aide d'une micropipette, puis déposer 0,5 ml de suspension cellulaire en milieu de culture (à une densité de  $1,2 \times 10^5$  cellules/ml) dans la chambre contenant

---

<sup>1</sup> Cellules ECh-T, N°RCB 2280, obtenues auprès de la banque de cellules RIKEN (Tsukuba, Japon). La signature d'un accord de transfert de matériel (MTA) avec RIKEN BRC est nécessaire avant d'appliquer la présente Ligne directrice.

<sup>2</sup> ad-MED Vitrigel™ (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japon.)

la CVM et incuber la plaque pendant deux jours à 37°C. Enlever alors délicatement le milieu de l'intérieur de la chambre à l'aide d'une micropipette et remplacer le milieu de culture extérieur par un milieu frais, puis incuber à nouveau les cellules pendant quatre jours à l'interface air/liquide, afin d'obtenir un modèle d'ECh. Changer le milieu de culture à l'extérieur de la chambre au troisième jour de culture à l'interface air/liquide.

### *Vérification de la qualité*

23. Le modèle d'ECh doit être doté d'une robustesse équivalente à celle de l'épithélium cornéen humain, afin d'éviter sa dégradation rapide après l'exposition aux produits chimiques. La fonction de barrière de chaque modèle d'ECh est vérifiée en mesurant sa TEER. Pour commencer, verser 500 µl de milieu de culture frais dans la chambre des modèles d'ECh et porter la température du milieu de culture à 28±2°C. Puis, positionner la plus longue des deux électrodes de l'appareil de mesure de la TEER (voir paragraphe « Mesure de la TEER d'un modèle d'ECh ») dans le milieu de culture extérieur à la chambre, et la plus courte dans le milieu à l'intérieur de la chambre, pour enfin mesurer la valeur de la TEER de chaque modèle d'ECh (TEER avant exposition). Seuls les modèles d'ECh dont les valeurs de TEER sont comprises dans une plage acceptable sont utilisés pour l'essai avec les produits chimiques, mené le jour même. Dans la MRV, les modèles d'ECh retenus pour l'essai sont ceux qui présentent une TEER comprise entre 140 Ω.cm<sup>2</sup> et 220 Ω.cm<sup>2</sup>.

### *Mesure de la TEER d'un modèle d'ECh*

24. La TEER d'un modèle d'ECh est mesurée à l'aide d'un ohmmètre électrique à courant alternatif basse tension. Les spécifications générales de l'appareil sont les suivantes : courant alternatif 50-1000 Hz, plage de mesure minimale 0,1-3 kΩ. Des images de l'appareil de mesure de la TEER utilisé dans la MRV<sup>3</sup> sont données à l'Annexe 3. Si un autre appareil est utilisé, il convient de démontrer qu'il produit les mêmes résultats. L'électrode mesure 23 mm de diamètre et 35 mm de longueur. L'électrode interne est installée dans la chambre, l'électrode externe à l'extérieur de la chambre. La distance entre les deux électrodes est fixe, car la distance influe sur la valeur de résistance électrique mesurée. De plus, pendant la mesure de la résistance, la profondeur d'immersion des électrodes dans le milieu ou dans la solution tampon à l'intérieur et à l'extérieur de la chambre est également fixe. La résistance électrique est mesurée pour les modèles d'ECh cultivés dans les chambres à CVM (R<sub>modèle</sub>) et pour l'essai à blanc dans une chambre à CVM vide (R<sub>blanc</sub>). La TEER d'un modèle d'ECh est calculée comme suit :

$$\text{TEER modèle d'ECh (}\Omega\cdot\text{cm}^2\text{)} = \{\text{R}_{\text{modèle}} (\Omega) - \text{R}_{\text{blanc}} (\Omega)\} \times \text{superficie effective (cm}^2\text{)}$$

25. La sensibilité de l'appareil de mesure de la TEER est vérifiée avant l'essai et une plage adéquate doit être obtenue. Pour ce faire, on mesure la résistance électrique de deux solutions au moins, dont les conductivités diffèrent, afin de confirmer que les différences de conductivité se situent dans les valeurs prédéterminées. Dans la MRV, les vérifications préalables à l'essai sont réalisées comme suit avec l'appareil de mesure de la TEER. Des chambres individuelles sans CVM (Vitrigel ad-MED sans CVM) sont placées dans deux puits de la plaque à 12 puits, puis l'un des puits est rempli avec 3,0 ml de solution aqueuse à 0,90 % NaCl, tandis que l'autre est rempli avec une solution aqueuse à 0,45 % NaCl à 25±5°C. Les TEER des deux puits sont ensuite mesurées

<sup>3</sup> Par exemple : appareil de mesure de la TEER (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japon).

avec l'appareil de mesure de la TEER. La valeur mesurée de la TEER est normale lorsque l'inégalité suivante est respectée :

$$\begin{aligned} & (\text{TEER solution aqueuse } 0,45 \% \text{ NaCl}) \\ & - (\text{TEER solution aqueuse } 0,90 \% \text{ NaCl}) \geq 60 \Omega \cdot \text{cm}^2 \end{aligned}$$

### *Préparation des substances témoins*

26. Dans la méthode du TIO Vitrigel®, le témoin négatif est une solution physiologique, le témoin positif est le chlorure de benzalkonium, et l'éthanol, qui induit une réponse de niveau moyen, est un témoin de référence. Le témoin de référence permet de vérifier la qualité des modèles d'ECh. Pour préparer les solutions des substances témoins dans le milieu de culture, à une concentration de 2,5 % (p/v), verser 0,1-0,2 g de chlorure de sodium, de chlorure de benzalkonium ou d'éthanol dans un tube à essai de 15 ml, puis ajouter un volume adéquat de milieu de culture et mélanger jusqu'à obtention d'une solution homogène. Des substances étalons peuvent également s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un produit chimique dans un spectre spécifique de réactions d'irritation.

### *Préparation des produits chimiques testés*

27. Une solution ou une suspension du produit chimique testé est préparée dans le milieu de culture, à une concentration de 2,5 % (p/v), car la résistance électrique d'une solution à cette concentration a généralement peu ou pas d'effet sur la résistance électrique du milieu de culture, quelle que soit la conductivité du produit chimique testé. Le produit chimique testé est mélangé manuellement dans le milieu, jusqu'à dissolution complète ou pendant une minute au maximum. Si le produit chimique testé est difficilement soluble, utiliser les techniques suivantes, dans cet ordre :

- a) mélangeur à vortex, pendant une minute au maximum,
- b) sonication, pendant 20 minutes au maximum,
- c) chauffage, jusqu'à 70°C au maximum.

Suite au mélange, la préparation du produit chimique testé est amenée à une température de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  en ayant recours à une plaque chauffante, à un bain-marie ou à un système de conditionnement de l'air, puis on procède à une vérification oculaire de la solubilité du produit chimique testé. L'étape suivante n'est effectuée qu'après obtention d'une solution ou d'une suspension homogène du produit chimique. Si un produit chimique testé se révèle insoluble ou non miscible avec toutes les techniques ci-dessus, la préparation prend la forme d'une suspension homogène et est obtenue par mélange au vortex du produit chimique testé dans le milieu pendant maximum une minute ; cette préparation est utilisée immédiatement.

On mesure le pH de chaque préparation de produit chimique à 2,5 % (p/v) avec un papier pH couvrant la gamme de 1 à 11, ou avec un pH-mètre. Si le pH d'une préparation à 2,5 % (p/v) est  $\leq 5$ , le produit chimique concerné n'est pas testé. Par ailleurs, l'absorbance de la préparation de produit chimique à 2,5% (p/v) est mesurée à 660 nm par spectrophotomètre UV-VIS à 0 et 3 minutes après la préparation. Si toutefois une longueur d'onde différente devra être utilisée en cas d'absorption à 660 nm perturbant la mesure. Dans le cas où la différence absolue mesurée est supérieure à 0.1, la préparation du produit chimique ne doit pas être testé.

*Application des produits chimiques testés et témoins*

28. Les modèles d'ECh qui réussissent le contrôle qualité sont exposés aux produits chimiques testés. Le modèle d'ECh est exposé à un produit chimique au plus tard deux heures après avoir été sorti de l'incubateur à CO<sub>2</sub>. Le milieu à l'intérieur de la chambre est remplacé par 500 µl de préparation du produit chimique testé, puis la valeur de R<sub>modèle</sub> est mesurée toutes les 10 secondes pendant les trois minutes qui suivent l'exposition au produit chimique. Dans chaque réplicat, un minimum de trois modèles d'ECh doit être utilisé pour chaque solution de substance témoin et pour chaque préparation de produit chimique testé. Le potentiel d'irritation oculaire du produit chimique testé est prédit sur la base des résultats d'un réplicat.

29. Pour une bonne reproductibilité de l'essai, il est indispensable que les premières mesures soient effectuées deux à cinq secondes après application du produit chimique testé. Il faut attendre au minimum deux secondes, car le liquide qui entoure l'électrode est souvent instable pendant les deux premières secondes qui suivent l'application de la préparation du produit chimique testé. Cependant, les mesures doivent commencer au maximum après cinq secondes, car la TEER du modèle d'ECh change après cinq secondes d'exposition au produit chimique testé.

30. Les modèles d'ECh et les préparations des produits chimiques testés sont maintenus à 28±2°C pendant l'exposition aux produits chimiques. Pour ce faire, on utilise une plaque chauffante, un bain-marie ou un système de conditionnement d'air. La température du modèle d'ECh peut être vérifiée en mesurant la température du milieu de culture extérieur à la chambre à un instant donné.

*Modèle prédictif*

31. Les valeurs de TEER du modèle d'ECh après l'exposition à un produit chimique testé sont calculées à l'aide de la formule fournie ci-avant, dans la section « Mesure de la TEER d'un modèle d'ECh ». Les moyennes des valeurs de TEER pour les trois tests sont analysées grâce aux trois indices suivants : délai (t1), intensité ( $-(P2 - P1) / [t2 - t1]$ ) et niveau plateau (100 - P2). On trouvera à l'Annexe 4 un graphique expliquant l'analyse d'un profil de TEER après exposition d'un modèle d'ECh à un produit chimique testé. Le score de chaque indice est alors calculé. Un produit chimique testé est considéré comme ne nécessitant aucune classification ni étiquetage selon le SGH de l'ONU (« Sans catégorie ») si les scores des indices sont : délai > 180 secondes et intensité < 0,05 %/seconde et niveau plateau ≤ 5,0 %, tel qu'au tableau 1. Dans ce cas, aucun essai supplémentaire suivant d'autres méthodes n'est nécessaire. Si l'on obtient des scores tels que délai ≤ 180 seconde ou intensité ≥ 0,05 %/seconde ou niveau plateau > 5,0 %, aucune prédiction définitive ne peut être faite à partir de ce seul résultat, tel qu'au tableau 1. En effet, en cas de vrai positif, la méthode ne permet pas de distinguer entre les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU. De plus, le test d'irritation oculaire Vitrigel® présente un taux élevé de faux positifs (voir paragraphe 14). Dans les deux cas, des informations ou essais supplémentaires sont nécessaires à des fins de classification, conformément au Document d'orientation relatif aux IATA (3).

Tableau 2. Modèles de prédiction d'après la classification du SGH de l'ONU\*

<i>Note</i>	<b>Critères</b>	<b>Prédiction</b>
	Délai $\leq$ 180 secondes ou Intensité $\geq$ 0,05 %/seconde ou Niveau de plateau $>$ 5,0 %	Aucune prédiction définitive ne peut être faite <sup>1</sup>
	Délai $>$ 180 secondes et Intensité $<$ 0,05 %/seconde et Niveau de plateau $\leq$ 5,0 %	Sans catégorie <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aucune prédiction définitive ne peut être faite lorsque des informations supplémentaires sur un produit chimique sont nécessaires pour le classer, conformément au Document d'orientation relatif aux IATA (3).

<sup>2</sup>« Sans catégorie » signifie que le produit chimique ne nécessite aucune classification pour irritation oculaire ni pour lésion oculaire grave selon le SGH de l'ONU.

\* Au moment d'établir une classification, il convient de tenir compte de tous les mécanismes de toxicité oculaire possibles et pertinents pour un produit chimique testé donné, en fonction des données et connaissances existantes, tel que décrit dans la LD 263 (2).

### *Critères d'acceptabilité*

32. L'acceptabilité des résultats de l'essai repose sur les critères suivants :
- a) témoin négatif : niveau de plateau  $\leq$  5 %,
  - b) témoin positif : niveau de plateau  $\geq$  40 %,
  - c) témoin de référence : niveau de plateau  $\geq$  10 %,
  - d) écart-type moyen pour l'ensemble du profil de TEER pour chaque produit chimique testé  $\leq$  15 %.

La gamme historique de résultats pour le témoin positif dans l'étude de validation est comprise entre 65 % et 90 %.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### *Résultats*

33. Les valeurs de TEER obtenues pour chaque modèle d'ECh, les données chiffrées de chaque indice et la prédiction finale selon le test d'irritation oculaire Vitrigel, doivent être consignées dans le rapport.

### *Rapport d'essai*

34. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

#### *Produit chimique testé et substances témoins*

- Substance mono-constituant : identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
- Substance multiconstituants, UVCB ou mélange : caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;

- État physique, pH, volatilité, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles ;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage par exemple) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

#### *Conditions d'application et mode opératoire de la méthode d'essai*

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- Description de la méthode d'essai utilisée ;
- Détails de la procédure d'essai utilisée ;
- Lignée cellulaire utilisée et source, nombre de repiquages et degré de confluence des cellules utilisées pour l'essai ;
- Fournisseur, numéro de catalogue et numéro de lot des réactifs ;
- Heure et date des repiquages des cellules d'ECh, durée de trypsinisation, pourcentage de dilution des cellules ;
- Durée de chaque étape de préparation des modèles d'ECh ;
- Résultats chiffrés du contrôle qualité de l'appareil de mesure de la TEER ;
- Données relatives à la préparation des produits chimiques testés (par exemple, poids du produit chimique testé, volume de milieu, technique de mélange et solubilité du produit chimique testé, pH de la préparation du produit chimique testé) ; valeur d'absorbance de la préparation de produit chimique à 660 nm à 0 et 3 minutes ;
- Température des modèles d'ECh et de la préparation chimique au début de l'exposition ;
- Numéro de lot du modèle d'ECh ;
- Heure du retrait du modèle d'ECh de l'incubateur à CO<sub>2</sub> et heure de l'exposition du modèle d'ECh au produit chimique testé ;
- Heure du début de la mesure de la TEER avec l'appareil de mesure ;
- Concentrations de produit chimique testé utilisées (si différente des recommandations) ;
- Durée d'exposition au produit chimique testé (si différente des recommandations) ;
- Nombre d'épreuves et nombre de modèles d'ECh utilisés par épreuve (si différents des recommandations) ;
- Description de toute modification apportée au mode opératoire ;

- 
- Déclaration de démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve) avant son application en routine.

#### *Résultats*

- Pour chaque produit chimique testé et chaque témoin, un tableau rassemble les valeurs de la TEER avant exposition et les valeurs en fonction du temps après exposition aux produits chimiques testés, sur une durée de trois minutes pour chaque modèle d'ECh utilisé, ainsi que les scores des trois indices et la prédiction *in vitro* associée au produit chimique testé ;
- Description des autres effets observés.

#### *Discussion des résultats*

#### *Conclusions*

## RÉFÉRENCES

1. United Nations UN (2019). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117131-0. Available at: [[https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev08/ST-SG-AC10-30-Rev8f.pdf](https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev08/ST-SG-AC10-30-Rev8f.pdf)].
2. OECD. (2021). Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. OECD (2019). Guidance Document No. 263 on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation (Second edition). Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. Takezawa T, et al. (2011). Development of a human corneal epithelium model utilizing a collagen vitrigel membrane and the changes of its barrier function induced by exposing eye irritant chemicals. *Toxicol in vitro* 25, 1237–1241.
5. Yamaguchi H, et al. (2013). Vitrigel-eye irritancy test method using HCE-T cells. *Toxicol Sci* 135, 347–355.
6. Yamaguchi H, et al. (2016). Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals. *J Appl Toxicol* 36, 1025-1037.
7. Scott L, et al. (2010) A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro* 24: 1-9.
8. Yamaguchi H and Takezawa T. (2019). Standard Protocol for the Vitrigel-EIT method, Version 1.82e. (May 20 2019). Available at: [[https://www.jacvam.jp/files/list/04/04\\_09\\_Z7.pdf](https://www.jacvam.jp/files/list/04/04_09_Z7.pdf)].
9. Kojima H, et al. (2019). Multi-laboratory Validation Study of the Vitrigel-Eye Irritancy Test Method as an Alternative to In Vivo Eye Irritation Testing. *Altern Lab Anim.* 47, 140-157.
10. OECD (2019), Report of the Validation Study and Report of the Peer Review of the Validation of the Vitrigel Eye Irritancy Test Method in Test Guideline 494. Series on Testing and Assessment No. 301. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
11. Reim M. (2003). The Ocular Surface: Barrier Function and Mechanisms of Injury and Repair, in *Alternative Toxicological Methods* (Salem H and Katz SA eds) pp. 89-108, CRC Press, Boca Raton.
12. Movahedan A, et al. (2013). Loss of Notch1 Disrupts the Barrier Repair in the Corneal Epithelium. *PLoS One* 8, e69113
13. Uematsu M, et al. (2007). Acute corneal epithelial change after instillation of benzalkonium chloride evaluated using a newly developed in vivo corneal transepithelial electric resistance measurement method. *Ophthalmic Res.* 39, 308–314.

14. Meloni M, et al. (2010). Occludin gene expression as an early in vitro sign for mild eye irritation assessment. *Toxicol in vitro* 24, 276–285.
15. ECETOC. (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No. 48. (2)), Brussels, Belgium.
16. National Institute of Environmental Health Sciences. (2010). Appendix J: NICEATM Analysis: Reduced Eye Hazard Labeling Resulting from Using Globally Harmonized System (GHS) Instead of Current U.S. Regulatory Classification Criteria. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products, National Institutes of Health Publication No. 10-7553, National Institutes of Health (2010): [http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\\_docs/invitro-2010/appj-analysis.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/invitro-2010/appj-analysis.pdf).
17. ICCVAM. (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document. NIH. Available at:  
[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\\_docs/STE-SRD-NICEATM508.pdf](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM508.pdf).
18. Farré R, et al. (2008). Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. *Gut* 57, 1366-1374.
19. Oshima, et al. (2012). Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. *Lab. Invest* 92, 22-31.
20. OECD (2018), Guidance Document on Good In vitro Method Practices (GIVIMP), Series on Testing and Assessment No. 286. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
21. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
22. Takezawa T, et al. (2004). Collagen vitrigel: a novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. *Cell Transplant* 13, 463–473.
23. Takezawa T, et al. (2007). Reconstruction of hard connective tissue utilizing a pressed silk sheet and type-I collagen as the scaffold for fibroblasts. *Tissue Engineering* 13, 1357–1366.
24. Takezawa T, et al. (2007). A protein-permeable scaffold of a collagen vitrigel membrane useful for reconstructing crosstalk models between two different cell types. *Cells Tissues Organs* 185, 237–241.
25. Takezawa T, et al. (2007). Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays in vitro and drug delivery systems in vivo,” *Journal of Biotechnology* 131, 76–83.
26. Takezawa T, et al. (2008). A novel culture model of rabbit corneal epithelium utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane and its cryopreservation,” *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 13, 176.

- 
27. OECD (2021), Performance Standards on Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Series on Testing and Assessment No. 313. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

## ANNEXE 1 – DÉFINITIONS

**Approche « bottom-up »** : approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif) (3).

**Approche « top-down »** : approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique testé présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif) (3).

**Catégorie 1 du SGH** : lésions oculaires graves/effets irréversibles sur l'œil (1).

**Catégorie 2 du SGH** : irritation oculaire/effets réversibles sur l'œil (1).

**Catégorie 2A du SGH** : irritant pour les yeux (1).

**Catégorie 2B du SGH** : modérément irritant pour les yeux (1).

**Danger** : effet nocif pour la santé ou l'environnement susceptible d'apparaître. L'effet nocif n'est observé qu'après une exposition d'un niveau suffisant (21).

**Domaine d'applicabilité** : description des propriétés physico-chimiques et autres propriétés d'un produit chimique testé pouvant être soumise à la méthode d'essai (26).

**ECh** : épithélium cornéen humain.

**Fiabilité** : indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (26).

**Irritation oculaire** : production de changements dans l'œil, totalement réversibles, suite à l'application d'un produit chimique ou d'un mélange sur l'œil (1).

**Lésion oculaire grave** : lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique ou d'un mélange sur l'œil, et qui n'est pas totalement réversible (1).

**Matrice en vitrigel de collagène (CVM)** : matrice composée d'une haute densité de fibrilles de collagène permettant de modéliser les tissus conjonctifs *in vivo* et facilement manipulable à l'aide de pinces. Cette matrice possède des propriétés d'excellente transparence et de grande perméabilité aux protéines de masse moléculaire élevée, et constitue par conséquent une matrice idéale de culture cellulaire (22 – 26). La chambre à CVM est préparée à partir d'une matrice en xérogel de collagène disponible dans le commerce.

**Mélange** : mélange ou solution constitué(e) de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles.

**MRV** : méthode de référence validée.

**Non classé selon le SGH (« sans catégorie »)** : produit chimique qui n'est pas classé au sens des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU (1).

**Normes de performance** : normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : (1) les éléments essentiels de la méthode

d'essai ; (2) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée ; et (3) les niveaux de précision et de fiabilité, comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (21).

**Pertinence** : décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (21).

**Précision** : étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Ce terme est souvent utilisé à la place de « concordance », pour exprimer la proportion de résultats corrects obtenus avec la méthode d'essai (26).

**Produit chimique** : substance ou mélange.

**Produit chimique testé** : le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est soumis à l'essai.

**Réplicat** : consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un témoin négatif, à un témoin positif et à un témoin de référence.

**Résistance électrique transépithéliale (TEER)** : résistance électrique d'un épithélium ou de couches de cellules épithéliales. Cette mesure constitue un indice jugé adapté à l'évaluation de l'intégrité des jonctions serrées de l'épithélium cornéen.

**Sensibilité** : proportion des substances positives/actives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (26).

**Spécificité** : proportion des substances négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (26).

**Stratégie d'essais à plusieurs niveaux** : démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique testé dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique testé peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée (21).

**Substance** : élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (1).

**Substance mono-constituant** : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (p/p).

**Substance multi-constituants** : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (p/p). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

**Superficie effective** : superficie du fond de la chambre à CVM.

**Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH)** : système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

**Taux de faux négatifs** : proportion de substances positives faussement identifiées comme négatives par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai (21).

**Taux de faux positifs** : proportion des substances négatives (non actives) faussement identifiées comme positives. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai (21).

**Témoin de référence** : échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive de niveau moyen dans ce système. Cet échantillon est traité en parallèle des échantillons exposés au produit chimique testé et des autres témoins, et sert à vérifier la qualité des modèles d'ECh.

**Témoin négatif** : échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour ne pas induire de réponse positive du système d'essai. Cet échantillon est traité en parallèle des échantillons exposés au produit chimique testé et des autres témoins, et sert à vérifier la pérennité des modèles d'ECh.

**Témoin positif** : échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

**UVCB** : substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

**Vitrigel** : chambre contenant une membrane de xérogel de collagène ad-MED Vitrigel®, utilisé pour la MRV. La définition du vitrigel est un gel se trouvant dans un état stable produit par réhydratation après vitrification d'un hydrogel traditionnel (22)(23)(24)(25)(26). L'élément littéral Vitrigel est un nom commercial de l'Organisation National de recherche en Alimentation et Agriculture (NARO) enregistré au Japon, aux Etats-Unis, dans l'Union européenne et en Chine.

## ANNEXE 2 – SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE APPLICABLES À LA MÉTHODE VITRIGEL DE TEST D'IRRITATION OCULAIRE

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente Ligne directrice, les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en identifiant correctement la classification des dangers pour l'œil des 10 substances recommandées dans le tableau 2. Les résultats de l'application du test d'irritation oculaire Vitrigel fournis constituent des exemples tirés des résultats obtenus pendant l'étude de validation (9, 10). La sélection comprend, autant que possible, des produits chimiques correspondant aux critères suivants :

- (i) couvrent la gamme complète des effets *in vivo* de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire selon le SGH de l'ONU (catégories 1, 2A, 2B ou « sans catégorie ») ;
- (ii) ont été choisis sur la base des données de haute qualité obtenues dans l'essai de référence *in vivo* sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) (2) ;
- (iii) couvrent un large spectre de classes chimiques et de groupes fonctionnels organiques, représentatifs des classes et groupes utilisés dans l'étude de validation (19) ;
- (iv) couvrent la gamme des réponses *in vitro* d'après des données de haute qualité issues du TIO Vitrigel ;
- (v) ont conduit à des prévisions correctes et reproductibles avec la MRV ;
- (vi) sont disponibles dans le commerce ;
- (vii) ne sont pas excessivement coûteux à acquérir et/ou éliminer.

Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou lorsque sa non-utilisation est justifiable, un autre produit chimique remplissant les conditions énoncées ci-dessus peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés pour la validation de la méthode Vitrigel de test d'irritation oculaire, ou un produit chimique de référence figurant dans les normes de performances. (27)

**Tableau 1. Produits chimiques recommandés pour démontrer les compétences techniques dans l'application de la méthode Vitrigel de test d'irritation oculaire**

1) N° CAS et propriétés physico-chimiques

	Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique	État physique	pH
<b><i>In vivo</i> Catégorie 1<sup>1</sup> du SGH de l'ONU</b>					
1	3-(2-Aminoéthylamino)propyl]triméthoxysilane	1760-24-3	Silicones	Liquide	10
2	Tétraéthylène glycol di acrylate	17831-71-9	Acrylates, Esters	Liquide	7
3	Salicylate de sodium	54-21-7	Sel organique	Solide	7
<b><i>In vivo</i> Catégorie 2A<sup>1</sup> du SGH de l'ONU</b>					
4	Cyclopentanol	96-41-3	Alcool	Liquide	7
5	Cyanoacétate de méthyle	105-34-0	Ester, composé de nitrile	Solide	7
<b><i>In vivo</i> Catégorie 2B<sup>1</sup> du SGH de l'ONU</b>					
6	Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	8
7	Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	609-14-3	Esters	Liquide	7
<b><i>In vivo</i> Sans catégorie<sup>1</sup> selon le SGH de l'ONU</b>					
8	<i>Iso</i> -Octylthioglycolate	25103-09-7	Composé du soufre, ester	Liquide	7
9	Tétrabromobisphénol A	79-94-7	Phénol aryl halide	Solide	7
10	4,4'-sulfonylbisbenzenamide	80-08-0	Dianiline sulfone	Solide	7

## 2) Résultats de l'essai

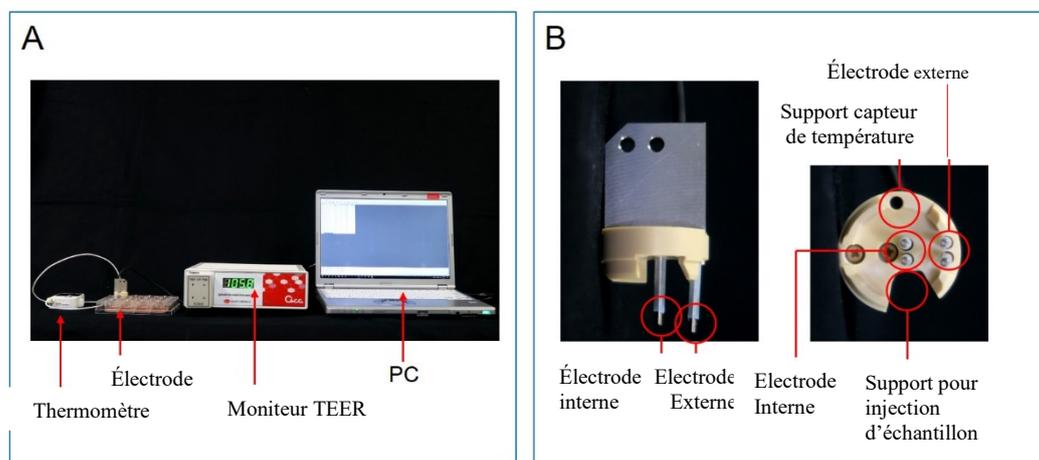
Nom chimique	Délai (secondes) <sup>2</sup>			Intensité (%/sec) <sup>2</sup>			Niveau plateau (%) <sup>2</sup>			Prédiction	
	Moyenne ± écart- type	Min.	Max.	Moyenne ± écart- type	Min.	Max.	Moyenne ± écart- type	Min.	Max.		
<b><i>In vivo</i> Catégorie 1<sup>1</sup> du SGH de l'ONU</b>											
1	3-(2-Aminoethylamino) Propyltriméthoxysilane	0 ± 0	0	0	0.36 ± 0.05	0.33	0.41	64 ± 8	60	73	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
2	Tétraéthylène glycol diacrylate	7 ± 12	0	20	0.23 ± 0.02	0.20	0.24	40 ± 5	35	43	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
3	Sodium salicylate	0 ± 0	0	0	0.48 ± 0.11	0.35	0.54	41 ± 3	38	43	Aucune prédiction ne peut être faite
<b><i>In vivo</i> Catégorie 2A<sup>1</sup> du SGH de l'ONU</b>											
4	Cyclopentanol	0 ± 0	0	0	0.29 ± 0.01	0.28	0.30	52 ± 2	51	55	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
5	Méthyle cyanoacétate	10 ± 10	0	20	0.10 ± 0.06	0.06	0.17	18 ± 11	11	30	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
<b><i>In vivo</i> Catégorie 2B<sup>1</sup> du SGH de l'ONU</b>											
6	Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	3 ± 6	0	10	0.22 ± 0.03	0.19	0.25	41 ± 6	34	46	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
7	Nitrate d'ammonium	0 ± 0	0	0	0.69 ± 0.12	0.58	0.82	29 ± 17	18	49	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
<b><i>In vivo</i> Sans catégorie<sup>1</sup> selon le SGH de l'ONU</b>											
8	Iso-Octylthioglycolate	(> 180)	(> 180)	(> 180)	-0.01 ± 0.01	-0.02	0.00	1 ± 1	0	2	Sans catégorie
9	Tetrabromobisphenol A	(> 180)	(> 180)	(> 180)	-0.02 ± 0.01	-0.02	-0.01	0 ± 0	0	0	Sans catégorie
10	4,4'- Sulfonylbisbenzamide	(> 180)	(> 180)	(> 180)	-0.02 ± 0.01	-0.03	-0.01	0 ± 0	0	0	Sans catégorie

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement dans le Chemical Abstracts Service ; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (1) ; MRV = Méthode de référence validée.

1) D'après les résultats issus de l'essai sur œil de lapin *in vivo* (OCDE LD 405) (2) et en utilisant le SGH de l'ONU. (1)

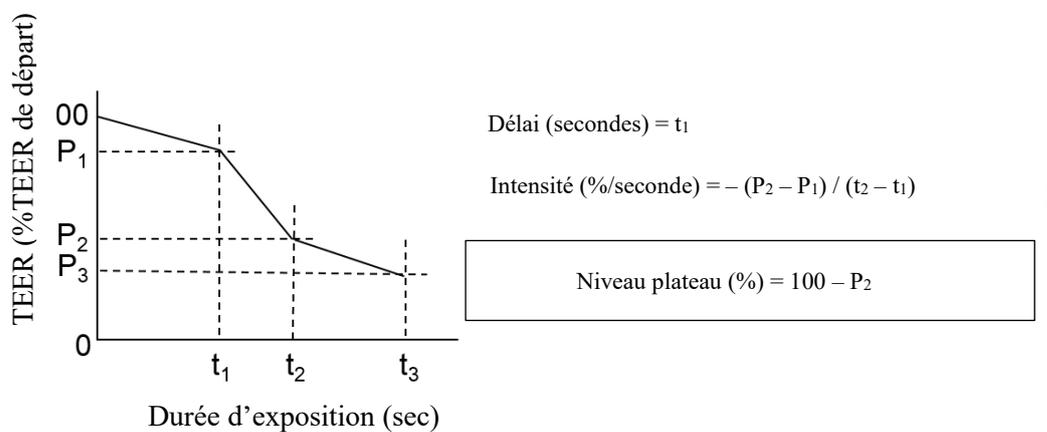
2) D'après les résultats issus de l'étude de validation de la méthode du TIO Vitrigel® (9,10). Les données pour les produits chimiques 5, 7, 9, et 10 sont basés sur les données générées par le développeur. Chaque score a été calculé à partir des données de trois réplicats. Trois modèles d'ECh étaient utilisés par réplicat.

ANNEXE 3 – IMAGES DE L'APPAREIL DE MESURE DE LA TEER



Appareil de mesure de la TEER (A) et électrodes (B)

ANNEXE 4 – GRAPHIQUE D'ANALYSE D'UN PROFIL DE TEER APRÈS EXPOSITION D'UN MODÈLE À UN PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ



Note :

- $t_1$  (seconde) : durée maximale pendant laquelle l'évolution est maintenue à  $0 \geq dP/dT > -0,03$  %/seconde.
- $t_2$  (seconde) : instant à partir duquel l'évolution est à nouveau maintenue à  $0 \geq dP (P_3 - P_2) / dT (t_3 - t_2) > -0,03$  %/seconde, après une période d'évolution à  $dP/dT \leq -0,03$  %/seconde.
- $t_3$  (seconde) :  $t_2 + 30$  secondes, car le niveau plateau est évalué d'après le profil mesuré sur 30 secondes.
- $P_1$  (%) : pourcentage de la TEER à  $t_1$  par rapport à la TEER à  $t = 0$  seconde.
- $P_2$  (%) : pourcentage de la TEER à  $t_2$  par rapport à la TEER à  $t = 0$  seconde.
- $P_3$  (%) : pourcentage de la TEER à  $t_3$  par rapport à la TEER à  $t = 0$  seconde.
- $dP / dT$  : la dérivée de P par rapport à t.