



Section 4
Effets sur la santé

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

25 juin 2024

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 Sur Modèle D'épithélium Cornéen Humain Reconstitué Pour L'identification De Produits Chimiques Dangereux Pour L'œil

INTRODUCTION

1. Une lésion oculaire grave est une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, et qui n'est pas totalement réversible, après exposition de l'œil à un produit chimique d'essai 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 suite à l'application d'un produit chimique sur l'œil et qui sont totalement réversibles. Les produits chimiques d'essai 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. Les produits chimiques d'essai non classés pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave sont définis comme ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU ; autrement dit, ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU (« sans catégorie »).

2. Au départ, l'évaluation des lésions oculaires graves/irritations oculaires impliquait le recours à des animaux de laboratoire [Ligne directrice de l'OCDE n° 405 (LD 405) ; adoptée en 1981 et révisée en 1987, 2002, 2012 et 2017] (2). Des méthodes *in vitro* ou *ex vivo* ont été adoptées dans les LD 437 (4), 438 (5), 460 (6), 491 (7), 492 (8), 494 (9) et 496 (10) de l'OCDE et permettent d'identifier les produits chimiques qui présentent un potentiel de lésions oculaires graves et/ou les produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie de danger pour l'œil. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente doit être envisagé dans le contexte du Document d'orientation de l'OCDE sur les Approches intégrées sur les essais et l'évaluation (IATA) pour les lésions oculaires graves et l'irritation oculaire (3).

3. La présente Ligne directrice décrit une procédure *in vitro* qui permet d'identifier à elle seule les produits chimiques (substances et mélanges) qui ne relèvent d'aucune catégorie (« sans catégorie ») ou qui nécessitent d'être classés pour irritation oculaire (catégorie 2) ou pour lésions oculaires graves (catégorie 1) selon la classification des dangers pour l'œil établie par le SGH de l'ONU (1).

4. Cette Ligne directrice décrit une méthode d'essai validée, en l'espèce l'essai SkinEthic™ de durée avant toxicité sur épithélium cornéen humain (ECh) (TTT ECh SkinEthic™), lequel emploie un épithélium cornéen humain reconstitué (EChR) disponible dans le commerce. L'EChR reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques de l'épithélium cornéen humain. Cette méthode d'essai a fait l'objet d'une étude de validation visant à déterminer sa capacité à identifier les trois catégories de danger oculaire du SGH de l'ONU (11)(12)(13) ; elle est

donc désignée comme la Méthode de référence validée (MRV) dans la présente Ligne directrice. L'étude de validation et son examen indépendant par des pairs (14) ont permis de conclure que l'essai TTT ECh SkinEthic™ peut correctement classer des produits chimiques (substances et mélanges) en faisant la distinction entre les trois catégories du SGH de l'ONU relatives aux lésions oculaires/à l'irritation oculaire, à savoir catégorie 1, catégorie 2 et « sans catégorie » (1) ; la méthode d'essai a donc été recommandée pour remplacer complètement le test *in vivo* de Draize pour la classification des produits chimiques présentant un risque d'irritation oculaire aiguë. Il est entendu que l'utilisation de cette Ligne directrice est soumise à des conditions et considérations réglementaires nationales et internationales. Il convient de consulter le Document d'orientation n° 263 relatif aux IATA pour connaître les autres essais *in vitro* adaptés qui peuvent être mis en œuvre dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve, si nécessaire (3). Les annexes II à V fournissent une synthèse des éléments principaux de la méthode d'essai, ainsi qu'un diagramme décisionnel applicable à des situations spécifiques.

5. L'objet de la présente Ligne directrice est de décrire le mode opératoire utilisé pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique d'essai présente pour l'œil, en se fondant sur sa capacité à provoquer une cytotoxicité sur un modèle tissulaire d'EChR, mesurée par la réduction d'un colorant vital (le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; bromure de tétrazolium bleu de thiazolyle ; N° CAS 298-93-1) désigné ci-après MTT (15) (voir paragraphe 23). La viabilité du tissu d'EChR après exposition à un produit chimique d'essai est déterminée par rapport à la viabilité de tissus traités avec la substance servant de témoin négatif (% viabilité) après deux ou trois durées d'exposition, puis est utilisée pour prédire le potentiel de danger du produit chimique d'essai pour les yeux.

6. Les définitions sont données à l'annexe I.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. Le modèle d'ECh SkinEthic™ est un modèle tissulaire tridimensionnel fabriqué à partir de cellules de l'espèce cible et qui reproduit fidèlement l'épithélium cornéen *in vivo* (17). La méthode d'essai mesure directement la cytotoxicité due à la pénétration d'un produit chimique dans l'épithélium cornéen et les lésions cellulaires et tissulaires qui font suite à l'exposition au produit chimique ; cette cytotoxicité permet de prédire le potentiel de danger que présente le produit chimique d'essai pour les yeux. Les lésions cellulaires peuvent être causées par plusieurs mécanismes d'action (voir paragraphe 16), mais la cytotoxicité joue un rôle mécanique majeur, sinon le rôle principal, dans l'ampleur de la réponse globale de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire après exposition à un produit chimique, réponse qui se manifeste *in vivo* principalement par l'opacité cornéenne, l'iritite, la rougeur conjonctivale et/ou le chémosis conjonctival, quels que soient les processus physicochimiques sous-jacents des lésions tissulaires.

8. Au total, 151 produits chimiques représentant de nombreux types, classes et structures chimiques, ou encore de nombreux poids moléculaires, LogP et autres propriétés physicochimiques, ont été testés dans l'étude de validation sur laquelle s'appuie la présente Ligne directrice. La base de données de validation est représentative de 134 groupes fonctionnels organiques différents (11)(12)(13) et de tous les principaux critères de classification *in vivo* (26)(27). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances monoconstituants (151 substances au total, dont 16 ont été diluées pour l'essai), mais

plusieurs substances multiconstituants étaient aussi incluses dans l'étude (notamment des tensioactifs et des polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU (1), les 151 produits chimiques d'essai étaient répartis comme suit : 70 liquides, dont 21 classés en catégorie 1, 25 en catégorie 2 (dont 16 en catégorie 2A et 9 en catégorie 2B) et 24 « sans catégorie » ; et 81 solides, dont 29 classés en catégorie 1, 19 en catégorie 2 et 33 « sans catégorie » (11)(12)(13).

9. La méthode TTT ECh SkinEthic™ n'est pas prévue pour différencier les produits chimiques relevant des catégories 2A (irritation oculaire, effets totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'exposition) et 2B (légère irritation oculaire, effets totalement réversibles dans les 7 jours suivant l'exposition) du SGH de l'ONU. Pour établir cette distinction et lorsque celle-ci est nécessaire, il convient d'employer d'autres méthodes ou approches (3).

10. La présente Ligne directrice peut être utilisée pour tester des produits chimiques (substances et mélanges) solides, liquides, semi-solides et sous forme de cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non ; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. On fera preuve de prudence lors d'essais de produits chimiques solides faiblement solubles dans l'eau (< 0.014 mg/mL), car ils ont souvent fait l'objet d'une sous-prédiction lors de l'étude de validation de la méthode SkinEthic™ appliquée aux solides (TTS ECh SkinEthic™) (par exemple, 5 produits chimiques sur 9 de catégorie 1 ont été sous-classés en catégorie 2). Les gaz et aérosols n'ont pas fait l'objet d'une étude de validation. Bien qu'il soit envisageable de les soumettre à l'essai en faisant appel à l'EChR, l'actuelle Ligne directrice ne permet pas de tester les produits de ce type. De plus, on dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité de la méthode d'essai à des substances multiconstituants ou à des mélanges (11). L'utilisation de la méthode d'essai est néanmoins techniquement possible pour les substances multiconstituants et pour les mélanges. S'il est démontré que la méthode décrite dans la présente Ligne directrice n'est pas applicable à des formulations spécifiques, cette méthode ne doit pas leur être appliquée. Avant d'appliquer la méthode d'essai à des produits chimiques difficiles à tester (substances instables, par exemple) ou à des produits chimiques ou mélanges à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette Ligne directrice, il convient d'examiner d'emblée si les résultats obtenus seront scientifiquement significatifs.

11. Les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le formazan (naturellement ou après traitement) et les produits chimiques d'essai pouvant directement réduire le colorant vital MTT (en formazan) peuvent interférer avec les mesures de la viabilité tissulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger l'essai en fonction de ces interférences. Le type de témoins adaptés nécessaire dépendra du type d'interférence que présente le produit chimique d'essai et de la procédure employée pour mesurer quantitativement le formazan (paragraphes 33-38).

12. L'étude de validation menée par trois laboratoires a démontré que la méthode TTT ECh SkinEthic™ est transférable aux laboratoires n'ayant jamais mené cet essai et peut être reproduite par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires (13)(14). La reproductibilité intra-laboratoire de la méthode SkinEthic™ était de 85-95% pour le mode opératoire TTL (sur 20 produits chimiques testés) et de 100% pour le mode opératoire TTS (sur 20 produits chimiques testés). La reproductibilité inter-laboratoire était de 90% pour TTL et 100% pour TTS.

13. La méthode TTT ECh SkinEthic™ peut être employée pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésions oculaires

graves au titre du SGH de l'ONU (1). Si l'on observe les données obtenues (13)(14) (tableau 1), cette méthode présente une exactitude équilibrée de 74.4 % (sur 151 produits chimiques) avec des prédictions correctes à 79 % pour la catégorie 1 (sur 50 produits chimiques), à 69 % pour la catégorie 2 (sur 44 produits chimiques) et à 75 % pour les produits chimiques « sans catégorie » (sur 57 produits chimiques) par comparaison avec les données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) (2)(16) et selon le système de classification du SGH de l'ONU (1). La performance de l'essai SkinEthic™ sur ECh est différente pour les liquides (mode opératoire TTL) et pour les solides (mode opératoire TTS) (annexe V).

Tableau 1. Performance pondérée¹ de l'essai TTT ECh SkinEthic™ représentée dans un tableau 3 x 3 montrant les prédictions correctes, les sous- et les sur-prédictions par catégorie du SGH de l'ONU.

Catégories du SGH de l'ONU	Catégories prédites par la méthode TTT ECh SkinEthic™ (n/N %)		
	Cat. 1 (n)	Cat. 2 (n)	Sans cat. (n)
Cat. 1 (N=50)	79.2 % (39.60)	20.8 % (10.40)	0 % (0.00)
Cat. 2 (N=44)	18.3 % (8.06)	69.2 % (30.46)	12.5 % (5.48)
Sans cat. (N=57)	1.8 % (1.00)	23.3 % (13.33)	74.9 % (42.67)

14. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est soumis à l'essai et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode sur EChR pour les essais sur des substances et/ou mélanges.

PRINCIPE DE L'ESSAI

15. Le produit chimique d'essai est appliqué localement sur au moins deux modèles tridimensionnels d'EChR et la viabilité tissulaire est mesurée après l'exposition et une période d'incubation post-rinçage. Les tissus d'épithélium cornéen humain SkinEthic™ sont reconstitués à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées, cultivées pendant plusieurs jours jusqu'à la formation d'un épithélium squameux stratifié, hautement différencié et morphologiquement semblable à l'épithélium cornéen humain. Le modèle tissulaire d'ECh SkinEthic™ est constitué d'au moins quatre couches cellulaires viables comprenant des cellules basales colonnaires, des cellules amplificatrices transitoires et des cellules superficielles squameuses et présentant une structure similaire à celle de l'épithélium cornéen humain normal (17) (18).

16. Les lésions oculaires graves ou l'irritation oculaire consécutives à l'application d'un produit chimique, qui se manifestent *in vivo* principalement par l'opacité cornéenne,

¹ Pour le calcul pondéré, chaque produit chimique reçoit le même poids de 1 dans la performance, quel que soit le nombre d'épreuves (c.-à-d., si, au cours de trois épreuves, le produit chimique A est classé en catégorie 1 deux fois et en catégorie 2 une fois, un poids fractionné de 0.66 (2/3) et de 0.33 (1/3) est attribué au nombre de prédictions (n) dans les catégories 1 et 2, respectivement (11)).

l'irritite et la rougeur conjonctivale et/ou le chémosis conjonctival, résultent d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du produit chimique à travers la cornée et/ou la conjonctive et la production de lésions cellulaires. Plusieurs mécanismes d'action peuvent provoquer des lésions cellulaires, parmi lesquels : la lyse de la membrane cellulaire (par des tensioactifs ou des solvants organiques, par exemple) ; la coagulation de macromolécules, notamment les protéines (par des tensioactifs, des solvants organiques, des alcalis et des acides, par exemple) ; la saponification des lipides (par des alcalis, par exemple) ; et l'alkylation ou d'autres interactions covalentes avec des macromolécules (par des agents de blanchiment, des peroxydes et des agents alkylants, par exemple) (19)(20)(21). Cependant, il a été démontré que la cytotoxicité joue un rôle mécanique important, sinon le rôle principal, dans l'ampleur de la réponse globale d'irritation oculaire/de lésion oculaire grave après exposition à un produit chimique, quels que soient les processus physicochimiques sous-jacents des lésions tissulaires (22). En outre, le potentiel de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'un produit chimique est déterminé principalement par l'ampleur de la lésion initiale (20), laquelle est corrélée avec l'étendue de la mort cellulaire (22) et avec l'ampleur des effets et conséquences éventuelles qui en découlent (23)(24). Par conséquent, les produits faiblement irritants n'ont en général d'effet que sur l'épithélium superficiel de la conjonctive et de la cornée, les produits modérément irritants affectent principalement l'épithélium et le stroma superficiel, et les produits gravement irritants provoquent des lésions de l'épithélium, du stroma profond et parfois de l'endothélium (22)(25). On mesure la viabilité du tissu d'EChR après exposition locale à un produit chimique d'essai afin de distinguer les produits chimiques ne nécessitant pas d'être classés pour les lésions oculaires graves/l'irritation oculaire (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU) de ceux nécessitant d'être classés et étiquetés (catégories 1 et 2 selon le SGH de l'ONU) en partant du principe que tous les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves ou une irritation oculaire présentent un caractère cytotoxique pour l'épithélium cornéen et/ou la conjonctive.

17. Dans la méthode TTT ECh SkinEthic™, la viabilité tissulaire de l'EChR est mesurée via la conversion enzymatique du MTT par les cellules viables du tissu en formazan coloré mesuré quantitativement après son extraction des tissus (15).

18. La méthode repose sur deux modes opératoires, le premier destiné aux liquides (TTL ECh SkinEthic™), le second aux solides (TTS ECh SkinEthic™). Elle nécessite trois durées d'exposition dans le mode opératoire TTL et deux durées d'exposition dans le TTS (voir paragraphes 29-30). Ces deux modes opératoires reposent sur des modèles de prédiction différents. Dans l'essai TTL ECh SkinEthic™, un produit chimique qui, pour toutes les durées d'exposition, provoque une viabilité moyenne inférieure ou égale à 50 % sera classé en catégorie 1, tandis qu'un produit chimique qui provoque une viabilité strictement supérieure à 50 % sera classé « sans catégorie ». Pour toute autre combinaison de viabilités moyennes, le produit sera considéré comme relevant de la catégorie 2 (voir paragraphe 43). Dans l'essai TTS ECh SkinEthic™, un produit chimique qui provoque une viabilité moyenne inférieure ou égale à 40 % après 30 minutes d'exposition et une viabilité moyenne inférieure ou égale à 60 % après 120 minutes d'exposition sera classé en catégorie 1. Un produit chimique qui provoque une viabilité moyenne strictement supérieure à ces seuils pour les deux durées d'exposition sera classé « sans catégorie ». Pour toute autre combinaison de viabilités moyennes, le produit sera considéré comme relevant de la catégorie 2 (voir paragraphe 43).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

19. Avant d'appliquer cette méthode d'essai en routine à des fins réglementaires, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les quatorze produits chimiques d'épreuve recommandés au tableau 2. Ces produits chimiques ont été sélectionnés parmi ceux utilisés lors de l'étude de validation de la méthode TTT ECh SkinEthic™ (13)(14). La sélection comprend, autant que possible, des produits chimiques qui : (i) couvrent plusieurs états physiques ; (ii) couvrent la gamme complète des effets *in vivo* de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'après les données de haute qualité obtenues avec le test de référence *in vivo* sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) (2)(16) et selon le SGH de l'ONU (catégories 1, 2 ou « sans catégorie ») (1) ; (iii) couvrent les principaux critères de classification *in vivo* (26)(27) ; (iv) sont représentatifs des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation (13) ; (v) couvrent un large spectre de groupes fonctionnels organiques (11)(12)(13) ; (vi) ont une structure chimique bien définie (11)(12)(13) ; (vii) ont donné des résultats reproductibles lors de la validation de la méthode d'essai sur EChR ; (viii) ont été classés correctement lors de la validation de la méthode d'essai sur EChR ; (ix) couvrent la gamme complète des réponses *in vitro* d'après des données de haute qualité issues de la méthode d'essai ; (x) sont disponibles dans le commerce ; et (xi) 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-avant peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés pour la validation de la méthode TTT ECh SkinEthic™. Ces changements doivent cependant être justifiés.

Tableau 2. Liste des substances d'épreuve pour la méthode SkinEthic™ applicable aux liquides (TTL) (tableau 2A) et aux solides (TTS) (tableau 2B)

Tableau 2A. Liste des substances d'épreuve pour la méthode TTL ECh SkinEthic™

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique ¹	État physique	Viabilité 15 min. (%) ^{2,3}	Viabilité 2 16 min. (%) ^{2,3}	Viabilité 3 120 min. (%) ^{2,3}	MRV Prédiction
<i>Catégorie 1 in vivo</i>							
N.N--Diéthyléthanolamine	100-37-8	Alcool. Amine aliphatique. Tertiaire	L.	2.9±1.7	1.0±1.3	0.6±0.5	Cat. 1
Acide acétique (10 %)	64-19-7	Acide carboxylique	L.	4.2±0.4	25.9±12.7	2.8±0.3	Cat. 1
<i>Catégorie 2 in vivo</i>							
2-butanone	78-93-3	Cétone	L.	21.1±5.4	90.8±13.7	87.6±12.3	Cat. 2
Acétone	67-64-1	Cétone	L.	6.4±2.6	97.1±3.9	99.1±3.5	Cat. 2
Chlorure d'hexadécyltriméthylammonium (2 %)	112-02-7	Sel d'ammonium. Sel d'alkylammonium.	L.	58.0±10.7	62.1±9.2	2.4±0.8	Cat. 2
<i>Sans Catégorie in vivo</i>							
1,3-Diisopropylbenzène	99-62-7	Cyclique. Phényle. Aromatique.	L.	100.5±8.5	94.5±6.3	96.5±9.3	Sans Cat.
Dodécane	112-40-3	Méthyle. Méthylène.	L.	98.3±6.9	103.1±5.6	98.9±5.1	Sans Cat.

Tableau 2B. Liste des substances d'épreuve pour la méthode TTS ECh SkinEthic™

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique ¹	État physique	Viabilité 1 30 min. (%) ^{2,3}	Viabilité 2 120 min. (%) ^{2,3}		MRV Prédiction
<i>Catégorie 1 in vivo</i>							
Naphtalène-1 acétate de sodium	61-31-4	Benzyle. Aromatique carboxylique. Naphtalène.	S.	1.6±0.7	1.6±0.4		Cat. 1
1,2-Benzisothiazol 3(2H)-one	2634-33-5	Benzothiazole/ Benzoisothiazole	S.	4.0±1.0	4.0±0.4		Cat. 1
<i>Catégorie 2 in vivo</i>							
4-carboxybenzaldéhyde	619-66-9	Aldéhyde. Aryle. Acide carboxylique	S.	80.1±12.3	5.0±1.4		Cat. 2
2-Hydroxy-1.4-naphtoquinone	83-72-7	Énol. Naphtoquinone	S.	82.1±8.9	4.5±1.5		Cat. 2
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Amine, Nitrate. Ammonium	S.	61.0±4.8	1.8±0.4	-	Cat. 2
<i>Sans Catégorie in vivo</i>							
Hydroxyde de carbonate de magnésium pentahydraté	56378-72-4	Magnésium Carbonate	S.	98.3±7.1	93.4±11.7		Sans Cat.
Anthracène	120-12-7	Anthracène. Aromatique carboxylique	S.	97.7±6.6	98.1±4.7		Sans Cat.

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement dans le Chemical Abstracts Service ; MRV = Méthode de référence validée, essai TTT ECh SkinEthic™.

¹Groupe fonctionnel organique déterminé d'après une analyse avec la boîte à outils QSAR de l'OCDE (version 3.2, <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>).

²Sur la base des résultats obtenus avec l'essai TTT ECh SkinEthic™ dans l'étude de validation (13)(14).

³Pour les liquides, l'essai TTL ECh SkinEthic™ teste trois durées d'exposition : les produits chimiques sont appliqués purs pendant 5 min (viabilité 1), et appliqués après dilution à 20 % (m/v) pendant 16 min (viabilité 2) et 120 min (viabilité 3). Pour les solides, l'essai TTS ECh SkinEthic™ teste deux durées d'exposition : les produits chimiques sont appliqués purs pendant 30 min (viabilité 1) ou 120 min (viabilité 2) (voir paragraphe 29).

20. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé aux utilisateurs de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'EChR (voir paragraphes 24, 25 et 27). Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode d'essai a été établie avec succès et que le laboratoire a acquis et démontré sa maîtrise sur cette méthode, il n'est plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes d'essai utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière à intervalles réguliers.

MODE OPÉRAIRE

21. La méthode d'essai couverte par la présente Ligne directrice est le test SkinEthic™ de durée avant toxicité sur ECh scientifiquement validé (14). Les modes opératoires normalisés des deux tests TTL et TTS ECh SkinEthic™ sont disponibles et doivent être suivis lors de la mise en œuvre et de l'emploi de la méthode d'essai en laboratoire (28)(29). Les paragraphes qui suivent et l'annexe II décrivent les principaux éléments et procédures de cette méthode d'essai sur EChR.

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR EChR

Conditions Générales

22. Des cellules dérivées de cellules humaines pertinentes sont utilisées pour reconstituer un modèle tridimensionnel de tissu épithélial cornéen, qui doit être composé de cellules progressivement stratifiées, mais non cornifiées. Le modèle d'EChR est préparé dans des plaques de culture avec une membrane synthétique poreuse au travers de laquelle les nutriments peuvent atteindre les cellules. Il comporte plusieurs couches viables de cellules épithéliales non kératinisées. Il présente une surface épithéliale en contact direct avec l'air, de façon à permettre une application locale directe des produits chimiques d'essai similaire à une exposition *in vivo* de l'épithélium cornéen aux produits chimiques. Le modèle d'EChR forme une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances cytotoxiques étalons telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS). Par exemple, la fonction barrière doit être démontrée et peut être évaluée en déterminant la concentration à laquelle une substance étalon réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après une durée de traitement donnée (p. ex., 30 minutes d'exposition à 50 µL de SDS) (voir paragraphe 27). Le modèle tissulaire présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que le produit chimique d'essai puisse contourner le tissu viable, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition de la cornée. Les cellules d'origine humaine utilisées dans le modèle sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique. Le fournisseur vérifie la stérilité du modèle tissulaire et l'absence de contamination mycosique ou bactérienne.

Conditions Fonctionnelles

Viabilité

23. La viabilité est mesurée au moyen du test MTT (15). Dans les cellules viables du modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan (formazan), qui est ensuite extrait du tissu avec de l'isopropanol (ou un solvant semblable). Le formazan extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance (densité optique, DO), soit suivant une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (28)(29). La DO de la solution de blanc seule (c'est-à-dire le solvant d'extraction pour le test MTT) doit être suffisamment faible, c'est-à-dire < 0.1. Les utilisateurs du modèle tissulaire s'assurent que chaque lot de tissu EChR remplit les critères définis pour le témoin négatif. Les plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif de l'essai TTT ECh SkinEthic™ sont précisées au tableau 3. Si la CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée, il convient d'utiliser la plage de DO du témoin négatif fournie au tableau 3 comme critère d'acceptabilité pour le témoin négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités avec la substance du témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition. Le producteur du tissu suit une procédure semblable dans le cadre du contrôle de qualité des lots de tissu, mais dans ce cas les critères d'acceptabilité applicables sont différents de ceux spécifiés au tableau 3. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs de DO du témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai du contrôle de qualité) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EChR.

Tableau 3. Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif (pour les utilisateurs de la méthode)

Méthode d'essai	Valeur limite inférieure d'acceptabilité	Valeur limite supérieure d'acceptabilité
TTT ECh SkinEthic™ (HCE/S) – MRV (pour les méthodes TTL et TTS)	> 1.0	≤ 2.5

Fonction barrière

24. Le modèle d'EChR doit être suffisamment épais et résistant pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques étalons. Cette capacité est évaluée par la valeur CI_{50} (SDS), par exemple (tableau 4). La fonction barrière de chaque lot de modèle d'EChR est démontrée par le développeur/fournisseur lors de la fourniture des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 27).

Morphologie

25. L'examen histologique du modèle d'EChR doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épithélium cornéen humain (comprenant au moins quatre couches de cellules épithéliales viables). Pour la MRV, une morphologie adéquate a été démontrée par le fournisseur et il n'est donc pas nécessaire de la démontrer à nouveau chaque fois qu'un utilisateur fait usage d'un lot.

Reproductibilité

26. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs doit être démontrée.

Contrôle de qualité

27. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'EChR démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 23) et à la fonction barrière. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour la fonction barrière telle que mesurée avec la CI_{50} est établie par le fournisseur du modèle d'EChR. Le tableau 4 indique la plage d'acceptabilité de la valeur CI_{50} retenue par le fournisseur des lots de tissu d'EChR (utilisés dans la méthode d'essai), lors du contrôle de qualité. Le fournisseur des tissus d'EChR doit fournir les données démontrant le respect de tous les critères de fabrication aux utilisateurs de la méthode d'essai, afin qu'ils puissent présenter ces informations dans le rapport d'essai. Seuls les résultats obtenus avec des tissus remplissant tous les critères de fabrication définis peuvent être considérés comme des prédictions fiables aux fins du classement des produits chimiques en fonction de leur dangerosité pour l'œil selon le SGH de l'ONU.

Tableau 4. Critères de contrôle de qualité applicables à la fabrication du modèle tissulaire d'ECh SkinEthic™

Méthode d'essai	Valeur limite inférieure d'acceptabilité	Valeur limite supérieure d'acceptabilité
TTT ECh SkinEthic™ (HCE/S) – MRV (traitement de 30 min avec 50 µL de SDS)	Cl ₅₀ = 1.0 mg/mL	Cl ₅₀ = 3.2 mg/mL

Application des produits chimiques d'essai et témoin

28. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus pour chaque durée d'exposition testée, par produit chimique d'essai et par substance témoin dans chaque épreuve. Deux modes opératoires différents sont employés, l'un pour les produits chimiques d'essai liquides et l'autre pour les produits chimiques d'essai solides (28)(29). Dans l'essai TTT ECh SkinEthic™, avant d'être exposée à un produit chimique d'essai, la surface des modèles tissulaires est pré-traitée avec du tampon phosphate salin de Dulbecco sans calcium et sans magnésium (DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺) suivant le mode opératoire applicable aux liquides, ou avec de l'eau suivant le mode opératoire applicable aux solides, afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions d'humidité de l'œil humain. Puis les tissus sont traités avec le(s) produit(s) chimique(s) d'essai ou avec les substances témoin. Dans les deux modes opératoires, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique d'essai ou de substance témoin pour recouvrir uniformément la surface épithéliale.

29. Les produits chimiques d'essai pouvant être appliqués à la pipette à 37 °C ou à des températures plus basses (au besoin, avec une pipette à piston) sont considérés comme des liquides dans la méthode d'essai. Dans le cas contraire, ils sont considérés comme des solides (voir paragraphe 30). Des procédures spécifiques sont prévues dans le mode opératoire normalisé pour le cas des liquides qui ne forment pas une solution ou une suspension stable (28). Dans la méthode d'essai, le produit chimique d'essai liquide est appliqué uniformément sur la surface de tissu (soit une application de 160±2 µL/cm²) (annexe II). Les tissus d'ECh SkinEthic™ sont exposés localement pendant trois durées différentes : les produits chimiques d'essai sont appliqués purs pendant 5 minutes, et sont appliqués dilués à 20 % (m/v) dans l'eau distillée pendant 16 minutes et 120 minutes dans les conditions prédéterminées de la méthode (28). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques d'essai liquides et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ à température ambiante. Cette étape de rinçage est suivie par une immersion post-traitement de 10 minutes dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique d'essai absorbé par le tissu), avant d'effectuer le test MTT (voir annexe II) (28).

30. Les produits chimiques d'essai qui ne peuvent pas être appliqués à la pipette (par exemple, les liquides très visqueux) sont considérés comme des solides dans cette méthode d'essai. La quantité appliquée doit être suffisante pour recouvrir complètement la surface de tissu, à savoir une application d'au moins 160±2 mg/cm² (voir annexe II). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Les tissus d'ECh SkinEthic™ sont exposés localement à des produits chimiques d'essai pendant 30 et 120 minutes dans les conditions de culture normalisées (voir annexe II) (29). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans

Ca²⁺/Mg²⁺ à température ambiante. Cette étape de rinçage est suivie par une immersion post-traitement de 30 minutes dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique d'essai absorbé par le tissu), avant d'effectuer le test MTT (annexe II) (29).

31. Des témoins négatifs et positifs sont utilisés simultanément dans chaque épreuve, afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du témoin négatif) et la sensibilité (dans le cas du témoin positif) des tissus se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. Le témoin négatif permet aussi de fixer la valeur de départ (viabilité à 100 %) à partir de laquelle est calculée la viabilité relative (en pourcentage) des tissus traités avec les produits chimiques d'essai (%viabilité_{test}). Le témoin positif recommandé pour l'essai TTT ECh SkinEthic™ est l'acétate de méthyle pur (N° CAS 79-20-9, disponible dans le commerce) suivant le mode opératoire applicable aux liquides et l'acide lactique à 1 % (m/v) dans l'eau (N° CAS 50-21-5, disponible dans le commerce) suivant le mode opératoire applicable aux solides. La substance recommandée comme témoin négatif est le DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ pour les liquides comme pour les solides. Ces substances sont celles qui ont été employées comme témoins dans les études de validation de l'essai TTT ECh SkinEthic™, et celles pour lesquelles il existe le plus de données historiques. L'utilisation d'autres substances adéquates comme témoins positif et négatif doit être dûment justifiée scientifiquement. Les témoins négatif et positif doivent être soumis aux mêmes modes opératoires que ceux utilisés pour les produits chimiques soumis à l'essai (liquides et solides). Leur application est suivie d'une exposition au traitement, d'un rinçage et d'une immersion post-rinçage, tel que décrit pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques liquides (voir paragraphe 29) ou avec les produits chimiques solides (voir paragraphe 30), avant d'effectuer le test MTT (voir paragraphe 32) (26)(27). Un seul témoin positif et un seul témoin négatif par épreuve suffisent pour tous les produits chimiques d'essai présentant le même état physique (liquide ou solide).

Mesure de la viabilité tissulaire

32. Le test MTT est une méthode quantitative normalisée (15) utilisée pour quantifier la viabilité des tissus dans la présente Ligne directrice. Il est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. Il est réalisé immédiatement après l'immersion post-rinçage. L'échantillon d'EChR est immergé dans 0.3 mL de solution MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 minutes dans les conditions de culture normalisées. Dans les cellules viables du tissu, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan. Le formazan est ensuite extrait à l'aide d'un volume adéquat d'isopropanol (ou d'un solvant similaire) (28)(29). Pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai liquides, l'extraction est faite à partir des couches supérieure et inférieure des tissus, tandis que, pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai solides ou à des liquides colorés, l'extraction est faite à partir de la seule couche inférieure du tissu (afin de réduire au minimum tout risque de contamination de la solution d'isopropanol d'extraction avec un résidu de produit chimique d'essai présent dans les tissus). Pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai liquides difficiles à rincer, l'extraction peut aussi être faite à partir de la seule couche inférieure du tissu. Les substances témoin positive et négative testées en parallèle sont traitées de la même manière que les produits chimiques d'essai. Le formazan extrait est quantifié soit par mesure de l'absorbance (DO) à 570 nm et avec un filtre passe-bande d'une largeur maximale de ±30 nm, soit par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir paragraphe 40).

33. Les propriétés optiques du produit chimique d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec le test MTT et de conduire à des estimations erronées de la viabilité des tissus, en l'occurrence à des sous-prédictions menant au classement dans la catégorie irritation oculaire. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'interférer avec la mesure du formazan par réduction directe du MTT en formazan (bleu) et/ou par interférence de couleurs s'ils absorbent, naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de DO que le formazan (c'est-à-dire autour de 570 nm). Il convient de vérifier avant l'essai si les produits chimiques ont le potentiel de réduire directement le MTT et/ou d'interférer avec la couleur (uniquement pour les produits chimiques colorés). En cas d'interférence avec le formazan, des vérifications supplémentaires doivent être effectuées pour corriger les interférences pouvant être causées par ces produits chimiques d'essai (voir paragraphes 34-36 et annexe III). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du modèle d'EChR lors du rinçage, ou lorsqu'il pénètre dans le modèle d'épithélium cornéen et est donc présent dans le tissu au moment où le test MTT est mené. Pour les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière dans la même plage que le formazan (naturellement ou après traitement), et qui sont incompatibles avec la mesure de la DO du formazan à cause d'une interférence excessive – absorption élevée à 570 ± 30 nm dans le cas du formazan –, une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie peut être effectuée pour mesurer la présence de formazan (voir paragraphes 39 et 40) (28). On trouvera dans les modes opératoires normalisés de la présente méthode d'essai (28)(29) une description détaillée de la manière de détecter la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants et corriger l'essai en conséquence. Un diagramme décisionnel présentant les étapes pour identifier et prendre en compte les produits chimiques réducteurs directs du MTT et/ou qui provoquent une interférence de couleurs est par ailleurs fourni à l'annexe III.

34. Pour repérer les interférences potentiellement causées par des produits chimiques d'essai absorbant la lumière dans la même plage que le formazan (naturellement ou après traitement), et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, on mélange le produit chimique d'essai à de l'eau et on l'incube pendant une durée appropriée à température ambiante (annexe II) (28)(29). Si l'on obtient une solution colorée en mélangeant le produit chimique d'essai avec de l'eau (voir annexe III), alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de la DO du formazan ; dans ce cas, des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée, auquel cas aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 39 et 40 et annexes III et IV). Lorsque les mesures de DO sont effectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence doit être appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et ces deux réplicats doivent être soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT à l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants (TNS_{vivants}) (28)(29). Le témoin TNS_{vivants} est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin TNS_{vivants} indépendant est doit être utilisé pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT ($\% \text{viabilité}_{\text{test}}$) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant

une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger (%TNS_{vivants}), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] – [%TNS_{vivants}].

35. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé. Une quantité adéquate de produit chimique d'essai est ajoutée à une solution MTT et le mélange est incubé pendant environ 3 heures dans les conditions de culture normalisées (voir annexe III) (28)(29). Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essai insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur des modèles de tissus d'EChR non viables, indépendamment du choix de mesurer la DO ou de procéder par analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Dans la méthode TTT ECh SkinEthic™, les tissus tués sont préparés par une incubation longue (au moins 24±1 h, par exemple) dans l'eau suivie d'un stockage à basse température (« tués dans l'eau »). Chaque produit chimique d'essai réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète pour générer un témoin de réduction non spécifique du MTT (MTTNS) (28)(29). Un seul témoin MTT non spécifique par produit chimique d'essai suffit, quel que soit le nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT (%viabilité_{test}) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%MTTNS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%MTTNS].

36. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une interférence de couleurs (voir paragraphe 34) et une réduction directe du MTT (voir paragraphe 35), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de la DO, en plus des témoins MTTNS et TNS_{vivants} décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques d'essai foncés qui absorbent la lumière à une longueur d'onde de 570±30 nm (bleus, violets, noirs, par exemple), comme le formazan, car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 35. Cela rend obligatoire par principe le recours à des témoins MTTNS et TNS_{vivants}. Les produits chimiques d'essai nécessitant la réalisation des deux témoins MTTNS et TNS_{vivants} sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent, dans ce cas, l'utilisation du témoin MTTNS peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs risque d'avoir lieu, étant donné que le témoin TNS_{vivants} permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette éventuelle double correction de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (TNS_{tués}) doit être préparé (annexe III) (28)(29). Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète, mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT à l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin TNS_{tués} par produit chimique d'essai suffit,

indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être étudié en parallèle du témoin MTTNS et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité_{test}) moins %MTTNS moins %TNS_{vivants} plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%TNS_{tués}), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%MTTNS] - [%TNS_{vivants}] + [%TNS_{tués}].

37. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et que des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter la DO de l'échantillon au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures de densité optique), et qu'une réduction non spécifique du MTT peut aussi élargir la surface de pic de formazan de l'échantillon au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par CLHP/CLUP-spectrophotométrie). Pour cette raison, lors d'essais menés avec des EChR, il importe que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité du spectrophotomètre pour la DO et pour le pic avec du formazan (N^oCAS 57360-69-7) disponible dans le commerce.

38. La mesure standard de la DO avec un spectrophotomètre est indiquée pour l'évaluation des produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT et causant une interférence de couleurs, lorsque l'interférence observée n'est pas trop forte par rapport à la mesure (c'est-à-dire lorsque les DO des extraits tissulaires obtenues pour le produit chimique d'essai sans correction de la réduction directe du MTT et/ou de l'interférence de couleurs sont comprises dans la plage de linéarité du spectrophotomètre). Néanmoins, les résultats de produits chimiques d'essai indiquant %MTTNS et/ou %TNS_{vivants} ≥ 50 % (pour les liquides) ou ≥ 60 % (pour les solides) du témoin négatif doivent être interprétés avec précaution. A contrario, la DO ne peut pas être mesurée lorsque l'interférence avec la mesure du formazan est forte (c'est-à-dire lorsque les DO non corrigées des échantillons testés sont situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre). Les produits chimiques d'essai colorés ou ceux devenant colorés au contact de l'eau qui interfèrent fortement avec la mesure de la DO du formazan peuvent cependant être évalués par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir annexe III), car cet appareillage permet de séparer le formazan du produit chimique d'essai avant la quantification. Pour cette raison, les témoins TNS_{vivants} et TNS_{tués} ne sont pas nécessaires quand on a recours à la CLHP/CLUP-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique soumis à l'essai. Les témoins MTTNS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 35). Les témoins MTTNS sont aussi nécessaires pour les produits chimiques d'essai colorés (naturellement ou au contact de l'eau) dont la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT, comme décrit au paragraphe 35. Lorsqu'on a recours à la CLHP/CLUP-spectrophotométrie pour quantifier le formazan, on calcule la viabilité tissulaire en mesurant la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai en pourcentage de la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : %viabilité_{test} moins %MTTNS, comme décrit à la dernière phrase du paragraphe 35.

39. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des échantillons soumis

à l'essai situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évaluées avec la présente méthode d'essai sur EChR ; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

40. La CLHP/CLUP-spectrophotométrie, appliquée pour mesurer le formazan, est utilisable avec tous les types de produits chimiques d'essai (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT). Étant donné la diversité des équipements de CLHP/CLUP-spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques. Pour cette raison, il faudra, avant d'utiliser l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie pour quantifier le MTT à partir d'échantillons, apporter la preuve de son efficacité en montrant qu'il remplit les critères d'acceptabilité avec un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la Food and Drug Administration des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (30)(31). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptabilité sont fournis à l'annexe IV. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'annexe IV ont été remplis, l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente Ligne directrice d'essai.

Critères d'acceptabilité

41. Pour chaque épreuve recourant à des lots de tissus d'EChR remplissant les critères du contrôle de qualité (voir paragraphe 27), les tissus traités avec le témoin négatif doivent présenter une DO qui reflète la qualité des tissus qui ont été transportés, réceptionnés et soumis à toutes les étapes du mode opératoire et qui se situe dans les limites historiques décrites au tableau 3 (voir paragraphe 23). Dans le cas du mode opératoire de la méthode TTL ECh SkinEthic™, les tissus traités avec la substance du témoin positif (c.-à-d., l'acétate de méthyle) doivent présenter une viabilité tissulaire moyenne $\leq 50\%$ à 5 minutes d'exposition et $> 50\%$ à 16 et 120 minutes, par rapport à la viabilité observée avec le témoin négatif. Dans le cas du mode opératoire de la méthode TTS ECh SkinEthic™, les tissus traités avec la substance du témoin positif (c.-à-d., l'acide lactique à 1 % (m/v) dans l'eau) doivent présenter une viabilité tissulaire moyenne $> 40\%$ de celle observée avec le témoin négatif à 30 minutes d'exposition, et telle que $20\% < \% \text{viabilité} \leq 70\%$ à 120 minutes, ce qui reflète la capacité des tissus de répondre à un produit chimique d'essai irritant dans les conditions de la méthode d'essai (28)(29).

42. La variabilité entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques d'essai et pour les substances témoin doit se situer dans la fourchette acceptable (différence de viabilité entre deux réplicats de tissus inférieure à 20 %, ou écart-type de trois réplicats de tissus ne dépassant pas 18 %). Si l'un des témoins (négatif ou positif) réalisés dans une épreuve se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'épreuve est considérée comme « non valable » et doit être refaite. Si la variabilité entre les réplicats de tissus pour un produit chimique d'essai se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'essai est considéré comme « non valable » et le produit chimique doit être à nouveau soumis à l'essai.

Interprétation des résultats et modèle de prédiction

43. Les valeurs de DO/surfaces de pic obtenues avec les répliqués d'échantillons pour chaque produit chimique d'essai sont utilisées pour calculer le pourcentage moyen de viabilité tissulaire (moyenne des répliqués de tissus) par rapport à la viabilité du témoin négatif (fixée à 100 %). Les seuils de viabilité tissulaire (en pourcentage) utilisés pour identifier et classer les produits chimiques en fonction de leur potentiel de danger pour l'œil et selon la classification du SGH de l'ONU, à savoir « sans catégorie » (non classé), catégorie 2 (irritation de l'œil) ou catégorie 1 (lésions oculaires graves), sont fournis au tableau 5. Les résultats sont donc interprétés comme suit :

- Le produit chimique d'essai est considéré comme ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'ONU (« sans catégorie ») si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-rinçage est supérieur (>) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire pour toutes les durées d'exposition.
- Le produit chimique d'essai est considéré comme provoquant des lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU (catégorie 1) si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-rinçage est inférieur ou égal (≤) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire pour toutes les durées d'exposition.
- Le produit chimique d'essai est considéré comme irritant pour l'œil selon le SGH de l'ONU (catégorie 2) si la combinaison des pourcentages moyens de viabilité cellulaire obtenus pour les différentes durées d'exposition ne satisfait pas aux critères fixés pour identifier le produit chimique d'essai comme étant « sans catégorie » ou pour le classer en catégorie 1, comme indiqué au tableau 5.

Tableau 5. Modèle de prédiction d'après la classification du SGH de l'ONU

	Sans Catégorie	Catégorie 2	Catégorie 1
TTL ECh SkinEthic™ (pour les liquides)	Viabilité tissulaire moyenne > 50 % pour toutes les durées de traitement	Toute autre combinaison de valeurs ¹	Viabilité tissulaire moyenne ≤ 50 % pour toutes les durées de traitement
TTS ECh SkinEthic™ (pour les solides)	Viabilité tissulaire moyenne > 40 % à 30 minutes et > 60 % à 120 minutes	Toute autre combinaison de valeurs ¹	Viabilité tissulaire moyenne ≤ 40 % à 30 minutes et ≤ 60 % à 120 minutes

¹. Toute combinaison de valeurs autre que celle permettant de conclure à un produit « sans catégorie » ou de catégorie 1.

44. Un seul essai comprenant au moins deux répliqués de tissus devrait suffire pour un produit chimique d'essai quand les résultats sont sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents répliqués et/ou un pourcentage moyen de viabilité tissulaire égal à une valeur seuil ± 5 % pour les différentes durées de traitement, une répétition doit être envisagée, voire une troisième épreuve en cas de résultats discordants entre les deux premières.

RÉSULTATS ET RAPPORT*Données*

45. Les données relatives à chaque réplicat de tissus dans une épreuve (valeurs DO/surfaces de pic de formazan, données calculées du pourcentage de viabilité tissulaire pour le produit chimique d'essai et pour les témoins, prédiction conclusive de la méthode d'essai sur EChR, par exemple) doivent être présentées dans un tableau pour chacun des produits chimiques d'essai, y compris les données des répétitions, le cas échéant. Il convient également de consigner le pourcentage moyen de viabilité tissulaire et la différence (si $n=2$ réplicats de tissus) ou l'écart-type (si $n \geq 3$ réplicats de tissus) pour chacun des produits chimiques d'essai et pour les témoins. Toute interférence avec la mesure du formazan observée à cause de la réduction directe du MTT et/ou d'une interférence de couleurs doit être indiquée pour chacun des produits chimiques soumis à essai.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai

Substance monoconstituant

- Identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
- État physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physicochimiques 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, broyage, par exemple) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Substance multiconstituant, 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 physicochimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, autant que possible ;
- État physique et autres propriétés physicochimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, autant que possible ;
- 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, broyage, par exemple) ;
- Conditions de stockage et stabilité, autant que possible.

Témoins positifs et négatifs

- Identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
- État physique, volatilité, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physicochimiques 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, broyage, par exemple) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Justification de l'utilisation d'un témoin négatif différent de ceux référencés à l'annexe II, s'il y a lieu ;
- Justification de l'utilisation d'un témoin positif différent de ceux référencés à l'annexe II, s'il y a lieu ;
- Référence aux données historiques des témoins positifs et négatifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité.

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.

*Modèle d'EChR et mode opératoire employés (explication des raisons du choix)**Conditions de la méthode d'essai*

- Modèle tissulaire d'EChR employé, y compris le numéro de lot ;
- Longueur d'onde et largeur de bande (le cas échéant) employées pour quantifier le formazan, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre) ;
- Description de la méthode de quantification du formazan employée ;
- Description de l'appareil de CLHP/CLUP-spectrophotométrie utilisé, le cas échéant ; la VLIQ, la VLSQ et les résultats de la courbe d'étalonnage et du contrôle de qualité employant le même type d'ajustement et de pondération que lors de la validation du CLHP/CLUP doivent figurer dans le rapport d'essai ;
- Informations complètes sur le modèle spécifique d'EChR utilisé, notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative) :
 - i. viabilité lors du contrôle de qualité (CQ) (fournisseur),
 - ii. viabilité dans les conditions de la méthode d'essai (utilisateur),
 - iii. fonction barrière lors du CQ (fournisseur),
 - iv. morphologie, selon les informations disponibles (fournisseur),

v. autres CQ des modèles tissulaires d'EChR, selon les informations disponibles (fournisseur) ;

- Référence aux données historiques du modèle tissulaire d'EChR, à savoir (liste non limitative) : acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots ;
- 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.

Critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai

- Moyennes et fourchettes de valeur acceptables pour les témoins positifs et négatifs, sur la base des données historiques ;
- Variabilité acceptable entre les répliquats de tissus pour les témoins positifs et négatifs ;
- Variabilité acceptable entre les répliquats de tissus pour les produits chimiques d'essai.

Mode opératoire :

- Détails du mode opératoire suivi (par exemple, version du mode opératoire normalisé) ;
- Doses de produit chimique d'essai et de substances témoins ;
- Durée et température des périodes d'exposition, d'immersion post-traitement et d'incubation post-traitement (le cas échéant) ;
- Description de toute modification éventuelle du mode opératoire ;
- Indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorés, s'il y a lieu ;
- Nombre de répliquats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et substance témoin (témoin positif, témoin négatif, MTTNS, TNS_{vivants} et TNS_{tués}, le cas échéant).

Résultats :

- Tableau de données pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin pour chaque épreuve (et ses répétitions, le cas échéant) et pour les mesures de chaque répliquat, y compris la valeur de DO ou la surface de pic de formazan, le pourcentage de viabilité tissulaire, le pourcentage moyen de viabilité tissulaire, la différence ou l'écart-type entre les répliquats de tissus, et la prédiction finale ;
- Le cas échéant, résultats obtenus avec les témoins utilisés pour les réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, y compris la valeur de DO ou la surface de pic du formazan, %MTTNS, %TNS_{vivants}, %TNS_{tués}, différence ou écart-type entre les répliquats de tissus, pourcentage final corrigé de viabilité tissulaire, et prédiction finale ;

- Résultats obtenus pour le(s) produit(s) chimique(s) d'essai et les substances témoin comparés aux critères d'acceptabilité applicables aux épreuves et à l'essai ;
- Description des autres effets observés, par exemple, coloration des tissus par un produit chimique d'essai coloré.

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Ninth revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [<https://unece.org/transport/standards/transport/dangerous-goods/ghs-rev9-2021>].
- OECD (2017). Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2020). Guideline for Testing of Chemicals No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2018). Guideline for Testing of Chemicals No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2017). Guideline for Testing of Chemicals No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2020). Guideline for Testing of Chemicals No. 491: Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2019). Guideline for Testing of Chemicals No. 492: Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2021). Guideline for Testing of Chemicals No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- OECD (2019). Guideline for Testing of Chemicals No. 496: *In vitro* Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- Alépée, N., Leblanc, V., Grandidier, MH., Teluob, S., Tagliati, V., Adriaens, E., Michaut, V. (2020) Development of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for identifying liquid chemicals not requiring classification and labelling and liquids inducing serious eye damage and eye irritation. *Toxicol. in Vitro* 69, 104960.

- Alépée, N., Leblanc, V., Grandidier, M.H., Teluob, S., Viricel, A., Adriaens, E., Michaut, V. (2021). SkinEthic HCE Time-to-Toxicity on Solids: A test method for distinguishing chemicals inducing serious eye damage, eye irritation and not requiring classification and labelling. *Toxicol. in Vitro* 75, 105203.
- Alépée, N., Grandidier, M.H., Teluob, S., Amaral, F., Caviola, E., De Servi, B., Martin, S., Meloni, M., Nardelli, L., Padelou, C., Tagliati, V., Viricel, A., Adriaens, E., Michaut, V. (2022). Validation of the SkinEthic HCE Time-to-Toxicity test method for eye hazard classification of chemicals according to UN GHS. *Toxicol. in Vitro*, 80, 105319. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105319>
- Barroso, J., Eskes, C., Germolec, D., Kim, B-H., Kojima, H. (2021). Peer Review Panel Report on the scientific validity of the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Time-To-Toxicity Test (TTT) on liquids (TTL) and on solids (TTS). January, 12, 2021.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390
- Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (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.
- Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.
- Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

- Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.
- Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *in vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.
- Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity on Liquids SOP, Version 1. (June 16, 2020). *In Vitro* Eye Irritation Time-To-Toxicity Test Method On Liquids (TTL): SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Model (HCE). Available at: [www.episkin.com/eye-irritation/Time-To-Toxicity].
- SkinEthic™ HCE Time-to-Toxicity on Solids SOP, Version 1. (June 16, 2020). *In Vitro* Eye Irritation Time-To-Toxicity Test Method On Solids (TTS): SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Model (HCE). Available at: [www.episkin.com/eye-irritation/Time-To-Toxicity].
- Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761
- US FDA (2018). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2018. Available at: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
- OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANNEXE A. DÉFINITIONS

Catégorie 1 du SGH : voir « lésion oculaire grave ».

Catégorie 2 du SGH : voir « irritation oculaire ».

CI₅₀ : concentration à laquelle un produit chimique étalon réduit la viabilité des tissus de 50 % après un temps d'exposition donné (p. ex., 30 minutes d'exposition au SDS).

CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance.

CLUP : chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance

Concordance : voir « Exactitude ».

Cornée : partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

CV : coefficient de variation.

Danger : propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population y est exposé(e).

DO : densité optique.

ECh SkinEthic™ : modèle d'épithélium cornéen humain SkinEthic™.

EChR : épithélium cornéen humain reconstitué.

Effets irréversibles sur l'œil : voir « lésion oculaire grave ».

Effets réversibles sur l'œil : voir « irritation oculaire ».

Épreuve : consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un témoin négatif et à un témoin positif.

Essai : consiste à tester en parallèle un même produit chimique sur au minimum deux réplicats de tissus, tel que défini dans le mode opératoire normalisé correspondant.

Essai substitutif : essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et produits chimiques d'essai possibles (9).

ET : écart-type.

Exactitude équilibrée : moyenne des taux de prédictions correctes dans chaque catégorie. Étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées, en tenant compte du déséquilibre dans la répartition entre les catégories.

Fiabilité : indique dans quelle mesure 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 intralaboratoire et interlaboratoire et la répétabilité intralaboratoire (32).

Formazan : produit coloré de la réduction du MTT.

Irritation oculaire : production de changements dans l'œil, totalement réversibles, suite à l'application d'une substance ou d'un mélange sur l'œil. Terme interchangeable avec « effets réversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 2 du SGH de l'ONU » (1), et avec les catégories facultatives 2A (effets totalement réversibles dans les 21 jours) et 2B (effets totalement réversibles dans les 7 jours).

Lésion oculaire grave : une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance chimique ou d'un mélange sur l'œil, et qui n'est pas totalement réversible. Terme interchangeable avec « effets irréversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 1 du SGH de l'ONU » (1).

LogP : logarithme du coefficient de partage octanol/eau.

Mélange : mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles (1).

Méthode d'essai valide : méthode d'essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Une méthode d'essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (31).

Méthode d'essai validée : méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment son exactitude) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes d'exactitude et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (31).

Mode opératoire normalisé : procédure écrite formelle décrivant en détail les modalités de réalisation en laboratoire de certaines opérations effectuées en routine ou dans le cadre d'un essai particulier. Le respect du mode opératoire normalisé fait partie des bonnes pratiques de laboratoire.

MRV : méthode de référence validée.

MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényltétrazolium, Bromure de tétrazolium bleu de thiazolyle. (N° CAS 298-93-1)

MTTNS : réduction non-spécifique du MTT.

Non classé selon le SGH de l'ONU : produit chimique ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU. Terme interchangeable avec « sans catégorie ».

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle indique à quel point l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de l'exactitude (concordance) d'une méthode d'essai (32).

Poids de la preuve : prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique d'essai et d'étayer cette conclusion.

Produit chimique : substance ou mélange.

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

Produit chimique étalon : produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon doit posséder les propriétés suivantes : (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables qui permettent son identification et sa caractérisation ; (ii) présenter une similitude structurale, fonctionnelle et/ou chimique avec le produit chimique soumis à l'essai, ou appartenir à une classe de produits chimiques similaire à celle du produit chimique soumis à l'essai ; (iii) posséder des caractéristiques physicochimiques connues ; (iv) être accompagné de données confirmant ses effets connus ; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

Reproductibilité : accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir « fiabilité ») (32).

Sans catégorie : produit chimique ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire (catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU) ou les lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU). Terme interchangeable avec « non classé selon le SGH de l'ONU ».

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies) : 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 l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

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

Substance multiconstituant : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multiconstituant résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multiconstituant est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multiconstituant résulte d'une réaction chimique.

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 subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins et sert à déterminer la viabilité tissulaire de 100 %.

Témoin positif : échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Il est soumis aux mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

TNS_{tués} : témoin de couleur non-spécifique dans les tissus tués.

TNS_{vivants} : témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants.

TTL : méthode de mesure de la durée avant toxicité sur le modèle d'ECh SkinEthic™, appliquée aux produit chimiques liquides.

TTS : méthode de mesure de la durée avant toxicité sur le modèle d'ECh SkinEthic™, appliquée aux produit chimiques solides.

TTT : méthode de mesure de la durée avant toxicité sur le modèle tissulaire d'ECh SkinEthic™.

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

Viabilité tissulaire : paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire dans un modèle tissulaire, définie comme sa capacité à réduire le colorant vital MTT, qui selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules.

VLIQ : valeur limite inférieure de quantification.

VLSQ : valeur limite supérieure de quantification.

**ANNEXE B. PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D’ESSAI TTT ECh SKINETHIC™
VALIDÉE POUR L’IDENTIFICATION D’UN POTENTIEL DE DANGER POUR L’ŒIL**

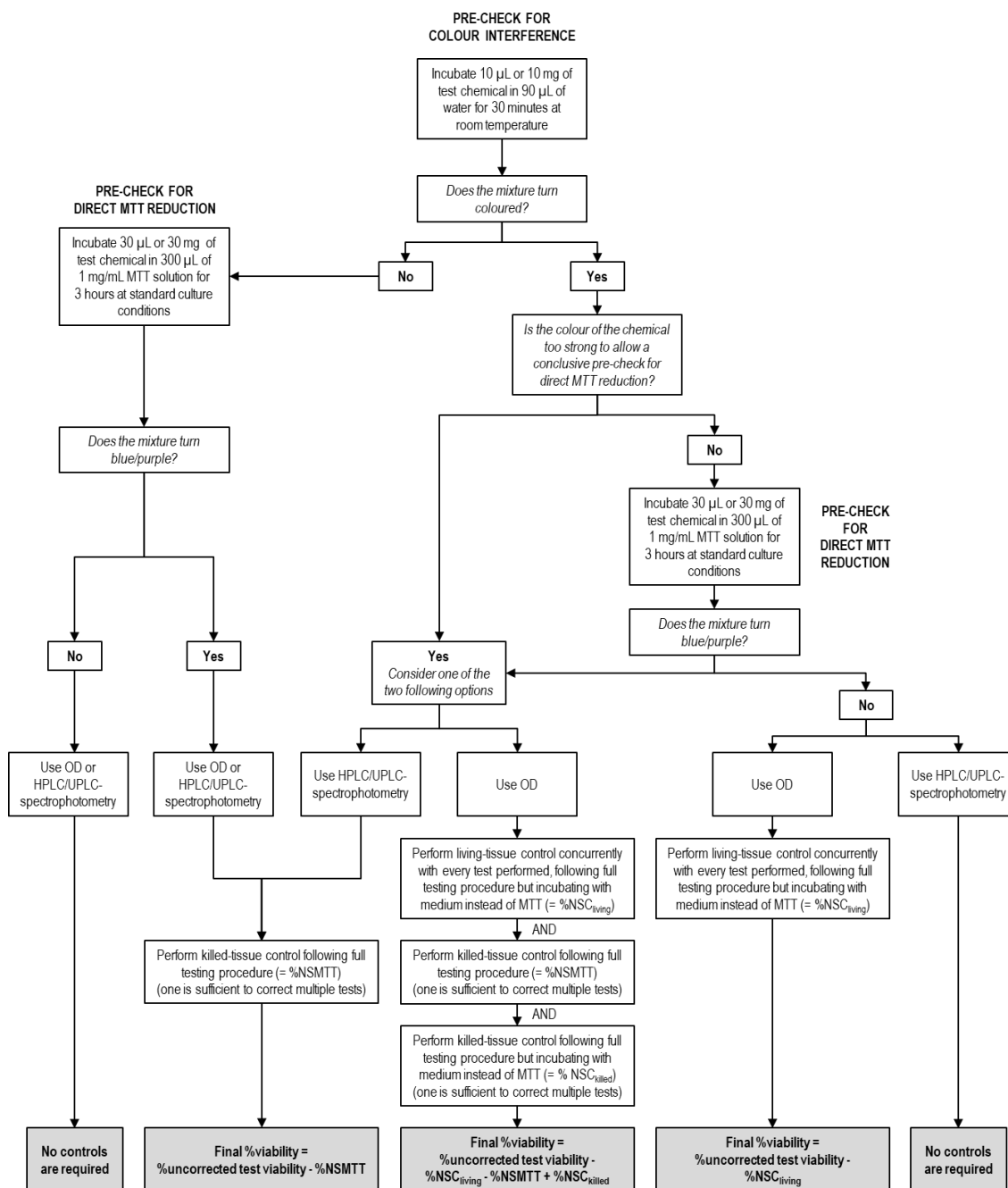
Éléments de la méthode d'essai	TTT ECh SkinEthic™ (MRV)	
Mode opératoire ¹	Mode opératoire TTL : produits chimiques d'essai liquides et visqueux (applicables à la pipette)	Mode opératoire TTS : produits chimiques d'essai solides (non applicables à la pipette)
Surface du modèle	0.5 cm ²	0.5 cm ²
Nombre de répliqués de tissus	Au moins 2	Au moins 2
Pré- et post-vérification de l'interférence de couleurs	10 µL + 90 µL H ₂ O mélangés pendant 30±2 min à température ambiante (TA ²) → si le produit chimique d'essai est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés	10 mg + 90 µL H ₂ O mélangés pendant 30±2 min à TA → si le produit chimique d'essai est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés
Pré- et post-vérification de la réduction directe du MTT	50-80 µL de produit chimique + 300 µL de solution de MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau (50-80 µL d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30-80 mg de produit chimique + 300 µL de solution de MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau (30-80 µL d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)

¹ Consulter la dernière version du mode opératoire normalisé pour obtenir de plus amples informations sur le mode opératoire, et l'appliquer lors de la mise en œuvre de la méthode d'essai en laboratoire (28-29).

² Température Ambiante (TA) : 18-28 °C

Doses et application du traitement	10 µL de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 80±2 µL (160 µL/cm ²) Pour les produits visqueux, utiliser du tulle de nylon	80±2 mg (160 mg/cm ²) (retenus si nécessaire pour recouvrir toute la surface des tissus) + 80 µL d'eau distillée Utiliser du tulle de nylon
Temps d'exposition et température	5 min (±15 s) (pur), 16 min (±1 min) (à 20 % (m/v) dans l'eau distillée) dans le milieu de culture à TA et 120 min (±2 min) (à 20 % (m/v) dans l'eau distillée) dans le milieu de culture à 37±2 °C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	30 min (±2 min) et 120 min (±5 min) (pur) dans le milieu de culture à 37±2 °C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %
Rinçage à température ambiante	25 mL de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (2 mL par pipettage)	25 mL de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (2 mL par pipettage)
Immersion post-rinçage	10 min (±1 min) à TA dans 4 mL de milieu de culture	30 min (±2 min) à TA dans 4 mL de milieu de culture
Témoin négatif	80±2 µL de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ - testé en parallèle	80±2 µL de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ - testé en parallèle
Témoin positif	80±2 µL d'acétate de méthyle testé en parallèle (N° CAS 79-20-9)	80±2 µL d'acide lactique à 1 % dans l'eau (m/v) testé en parallèle (N°CAS 50-21-5)
Solution de MTT	300 µL à 1 mg/mL	300 µL à 1 mg/mL
Incubation et température du MTT	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %
Solvant d'extraction	1.5 mL d'isopropanol (750 µL dessous et 750 µL dessus) (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1.5 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessous de l'insert)
Durée et température d'extraction	Au moins 2 h avec agitation (~120 rpm) à TA ou au moins une nuit sans agitation à 4-10 °C	Au moins 2 h avec agitation (~120 rpm) à TA
Lecture de la DO	570 nm (540-600 nm) sans filtre de référence	570 nm (540-600 nm) sans filtre de référence
Contrôle de qualité des tissus	Traitement pendant 30±2 min avec du SDS (50 µL) 1.0 mg/mL ≤ Cl ₅₀ ≤ 3.2 mg/mL	Traitement pendant 30±2 min avec du SDS (50 µL) 1.0 mg/mL ≤ Cl ₅₀ ≤ 3.2 mg/mL
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (TN) est > 1.0 et ≤ 2.5 2. La viabilité moyenne du témoin positif, exprimée en % de celle du TN, est ≤ 50 % à 5 min d'exposition et > 50 % à 16 et 120 min 3. La différence de viabilité entre deux réplicats de tissus ne dépasse pas 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (TN) est > 1.0 et ≤ 2.5 2. La viabilité moyenne du témoin positif, exprimée en % de celle du TN, est > 40 % à 30 min d'exposition et comprise dans l'intervalle 20 % < TP ≤ 70 % à 120 min 3. La différence de viabilité entre deux réplicats de tissus ne dépasse pas 20 %.

ANNEXE C. DIAGRAMME DÉCISIONNEL POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES D'ESSAI RÉDUCTEURS DIRECTS



DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE L'ESSAI TTT Ech SKINETHIC™

ANNEXE D. PRINCIPAUX PARAMÈTRES ET CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ DE LA PREUVE D'EFFICACITÉ D'UN SYSTÈME DE CLHP/CLUP-SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR LA MESURE DU FORMAZAN EXTRAIT D'UN MODÈLE TISSULAIRE D'EChR

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (43)(45)	Critères d'acceptabilité
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, du blanc vivant (extrait de modèle tissulaire d'EChR vivant sans traitement dans l'isopropanol), du blanc tué (extrait de modèle tissulaire d'EChR tué sans traitement dans l'isopropanol) et d'un colorant (bleu de méthylène, par exemple)	Surface ^{interférence} ≤ 20 % de la surface ^{VLIQ} ¹
Fidélité	Contrôles de qualité (c'est-à-dire, bleu de formazan à 1.6 µg/mL, 16 µg/mL et 160 µg/mL) dans l'isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Exactitude	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Écart ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Effet de matrice	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	85 % ≤ % effet de matrice ≤ 115 %
Effet résiduel	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ ² normale	Surface ^{interférence} ≤ 20 % de la Surface ^{VLIQ}
Reproductibilité (même jour)	3 courbes d'étalonnage indépendantes (établies sur la base de 6 dilutions de formazan au 1/3 consécutives dans l'isopropanol, avec point de départ VLSQ, soit 200 µg/mL) ; Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Courbes d'étalonnage : % Écart ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1 : 1 courbe d'étalonnage et Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2 : 1 courbe d'étalonnage et Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3 : 1 courbe d'étalonnage et Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	Contrôles de qualité : % Écart ≤ 15 % et CV ≤ 15 %
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de 24 heures à température ambiante	% Écart ≤ 15 %
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de plusieurs jours à -20 °C	% Écart ≤ 15 %

¹VLIQ : valeur limite inférieure de quantification, définie comme correspondant à une viabilité tissulaire de 1-2 %, soit 0.8 µg/mL.

²VLSQ : valeur limite supérieure de quantification, définie comme au moins deux fois la concentration maximale attendue de formazan dans les extraits d'isopropanol issus des témoins négatifs (~70 µg/mL selon la MRV), soit 200 µg/mL.

ANNEXE E. PERFORMANCE DE LA MÉTHODE TTT ECh SKINETHIC™ APPLIQUÉE AUX LIQUIDES ET AUX SOLIDES DANS UN TABLEAU 3 x 3 RÉSUMANT LES PRÉDICTIONS CORRECTES ET LES SOUS- ET SUR-PRÉDICTIONS DANS LES CATÉGORIES DU SGH DE L'ONU⁴

Tableau 1. Performance de la méthode d'essai TTL ECh SkinEthic™

Catégories du SGH de l'ONU	Catégories prédites par la méthode TTL ECh SkinEthic™		
	Cat. 1	Cat. 2	Sans Cat.
Cat. 1 (N=21)	85.4 %	14.6 %	0.0 %
Cat. 2 (N=25)	20.2 %	79.8 %	0.0 %
Sans Cat. (N=24)	0.0 %	20.8 %	79.2 %

Tableau 2. Performance de la méthode d'essai TTS ECh SkinEthic™

Catégories du SGH de l'ONU	Catégories prédites par la méthode TTS ECh SkinEthic™		
	Cat. 1	Cat. 2	Sans Cat.
Cat. 1 (N=29)	74.7 %	25.3 %	0.0 %
Cat. 2 (N=19)	15.8 %	55.3 %	28.9 %
Sans Cat. (N=33)	3.0 %	25.3 %	71.7 %

⁴ La variabilité entre essai du test de Draize pour l'irritation de l'œil a été évaluée par Barroso et al (2017) pour les produits chimiques pour lesquels plus d'une étude indépendante a été conduite par des laboratoires différents. Pour les produits chimiques pour lesquels au moins une des études a conclu à une classification en Cat.1 parmi les différentes études répétées, la concordance d'ensemble des classifications de 62.5% (10/16) a été calculée pour Cat.1 SGH ONU. Pour les produits chimiques pour lesquels au moins une des études a conclu à une classification en Cat.2 parmi les différentes études répétées, la concordance d'ensemble des classifications de 38.5% (5/13) a été calculée pour Cat.2 SGH ONU. Pour les produits chimiques pour lesquels au moins une des études a conclu à une non classification (ou « Sans Cat. ») parmi les différentes études répétées, la concordance d'ensemble des classifications de 89.5% (17/19) a été calculée pour les non classés (« Sans Cat. ») du SGH ONU.