



Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 491

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

4 juillet 2023

**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 De Courte Durée In Vitro Pour Le Potential D'Irritation De L'oeil

INTRODUCTION

1. La méthode d'exposition de courte durée (Short Time Exposure, STE) est une méthode d'essai in vitro qui, dans certaines circonstances et assortie de restrictions spécifiques, peut être utilisée pour la classification des dangers et l'étiquetage des produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves ou ne relevant d'aucune classification pour lésion oculaire grave ou irritation oculaire, conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1).

2. Pendant de nombreuses années, les dangers potentiels pour l'œil que présentent les produits chimiques ont été principalement évalués par des tests in vivo effectués sur des yeux de lapins (LD 405). La(les) méthode(s) décrites dans la présente Ligne directrice ne peuvent pas être utilisées toute(s) seule(s) pour remplacer le test de Draize in vivo pour prédire la gamme complète de potentiel irritant pour les différentes classes de produits chimiques. Il est recommandé de recourir à l'utilisation de stratégies d'essai alternatives telles que celles décrites dans les Lignes directrices 467 et 492B pour couvrir la gamme complète de potentiel irritant. La combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test sur les yeux de lapin (2). L'approche « top-down » est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant ou puisse provoquer de graves lésions oculaires, alors que l'approche « bottom-up » est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne pas causer une irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification. Alors que la méthode STE n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai in vivo sur œil de lapin, son utilisation est acceptable comme élément d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux visant à établir une classification et un étiquetage réglementaires, telle que l'approche « top-down »/« bottom-up », pour identifier sans expérimentation supplémentaire les produits chimiques (i) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et (ii) les produits chimiques (à l'exception de tous les produits solides autres que les tensioactifs) qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« sans catégorie » du SGH de l'ONU) (1) (2). Toutefois, un produit chimique qui, avec la méthode STE, n'est pas identifié comme provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) ou comme ne relevant d'aucune classification (« sans catégorie » du SGH de l'ONU) nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires visant à établir une classification définitive. En outre, les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre la

méthode STE dans une approche « bottom-up » dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette Ligne directrice doivent être envisagées dans le contexte du Document d'Orientation de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (14).

3. L'objet de la présente Ligne directrice (LD) est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique testé présente pour l'œil, mesuré par le caractère cytotoxique du produit chimique lors d'un test d'exposition de courte durée (STE). L'effet cytotoxique des produits chimiques sur les cellules épithéliales cornéennes est un mécanisme d'action important qui provoque des lésions de l'épithélium cornéen et une irritation oculaire. Dans la méthode d'essai STE, la viabilité cellulaire est évaluée par un dosage quantitatif des cristaux de formazan bleu extraits des cellules et produits par les cellules vivantes lors de la conversion enzymatique du colorant vital MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), encore appelé Bleu de thiazol (3). La viabilité cellulaire observée après 5 minutes d'exposition est comparée à celle du témoin avec solvant (viabilité relative) et utilisée comme estimation du danger potentiel pour les yeux que présente le produit chimique testé. Les produits chimiques testés sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU lorsqu'une viabilité cellulaire inférieure ou égale à (\leq) 70% est observée aux deux concentrations testées (5 % et 0.05 %). À l'inverse, les produits chimiques pour lesquels la viabilité cellulaire est supérieure à ($>$) 70 % aux deux concentrations testées (5 % et 0.05 %) sont classés « sans catégorie » selon le système SGH.

4. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est testé et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode STE pour les essais sur des substances et/ou mélanges. Les définitions sont données à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. La présente Ligne directrice est basée sur un protocole expérimental mis au point par Kao Corporation (4). Ce protocole a fait l'objet de deux études de validation différentes : l'une par le Comité de validation de la Société japonaise pour les méthodes alternatives aux expérimentations animales (JSAAE) (5), l'autre par le Centre japonais de validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (6). Un examen par les pairs a été conduit par le NICEATM/ICCVAM sur la base des rapports des études de validation et des documents de référence (BRD) relatifs à la méthode d'essai (7).

6. Lors de l'utilisation de la méthode d'essai STE pour l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) pouvant provoquer de graves lésions oculaires (Catégorie 1 du SGH de l'ONU (1)), les données obtenues pour 125 produits chimiques (substances et mélanges) ont démontré une précision globale de la méthode de 83 % (104/125), un taux de faux positifs de 1 % (1/86) et un taux de faux négatifs de 51 % (20/39) par comparaison avec les données obtenues avec la méthode in vivo sur œil de lapin (7). Le taux de faux négatif observé n'est pas préoccupant dans le contexte de cet essai, étant donné que tous les produits chimiques qui induisent une viabilité cellulaire \leq 70% à une concentration de 5 % et $>$ 70 % à une concentration de 0.05 % (voir Tableau 2 : Modèle de prédiction)devront être testés à nouveau à l'aide de méthodes d'essai in vitro dûment validées ou, en dernier recours, avec la méthode in vivo sur œil de lapin, en fonction des exigences de la réglementation et selon la démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve actuellement recommandée (1) (8). Ce sont principalement des substances mono-constituant qui ont été testées, même si l'on dispose également d'un nombre limité de données relatives à l'essai de mélanges. La méthode est néanmoins techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques et substances difficile à tester (parce qu'instable par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il

convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables. Aucune autre limite particulière de la méthode d'essai STE n'a été mise en évidence lors de son application pour l'identification de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU. L'application de cette méthode d'essai peut être envisagée pour tester des produits chimiques, une viabilité cellulaire ≤ 70 % aux deux concentrations (5 % et 0.05 %) étant alors considérée comme l'indicateur d'un effet provoquant des lésions oculaires graves qui justifie de classer le produit chimique d'essai dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire.

7. Lors de l'utilisation de la méthode d'essai STE pour l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« sans catégorie » du SGH de l'ONU), les données obtenues pour 130 produits chimiques (substances et mélanges) ont démontré une précision globale de la méthode de 85 % (110/130), un taux de faux négatifs de 12 % (9/73) et un taux de faux positifs de 19 % (11/57) par comparaison avec les résultats obtenus avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin (7). Si l'on exclut des données celles relatives aux substances hautement volatiles (c'est-à-dire avec une pression de vapeur mesurée supérieure à 6kPa) et aux substances solides autres que les tensioactifs, la précision globale est de 90 % (92/102), le taux de faux négatifs est de 2 % (1/54) et le taux de faux positifs est de 19 % (9/48) (7). Des travaux supplémentaires ont montré que les substances hautement volatiles peuvent être correctement testées en ayant recours à l'utilisation d'huile minérale au lieu de la solution physiologique comme solvant (15). La précision de la méthode d'essai STE pour les substances hautement volatiles (c'est-à-dire avec une pression de vapeur mesurée supérieure à 6kPa) était alors de 95% (19/20), le taux de faux négatifs était de 0% (0/7), et le taux de faux positifs était de 8% (1/13). En conséquence, la limite potentielle de la méthode d'essai STE lors d'une utilisation pour l'identification de substances ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« sans catégorie » du SGH de l'ONU) est un taux élevé de faux négatifs pour les produits chimiques solides (substances et mélanges) en dehors des tensioactifs et mélanges composés uniquement de tensioactifs. Ces produits chimiques sont exclus du domaine d'applicabilité de la méthode d'essai STE (7). Dans la mesure du possible, les produits chimiques d'essai qui sont sensibles à l'hydrolyse devraient être évalués dans des conditions qui ne favorisent pas l'hydrolyse afin d'éviter de possibles faux résultats négatifs.

8. Outre les données relatives aux produits chimiques mentionnés aux paragraphes 6 et 7, les ensembles de données générés avec la méthode d'essai STE comprennent des données internes pour 40 mélanges, lesquelles, par comparaison avec les données issues des essais selon la méthode *in vivo* de Draize, démontrent une précision de la méthode de 88 % (35/40), un taux de faux positifs de 50 % (5/10), et un taux de faux négatifs de 0 % (0/30) pour l'analyse de mélanges ne relevant d'aucune classification selon le SGH de l'ONU (9). La méthode d'essai STE est donc applicable dans une approche « bottom-up » pour l'identification de mélanges « sans catégorie » dans le SGH de l'ONU, à l'exception des mélanges solides autres que ceux composés uniquement de tensioactifs, par extension des limitations applicables aux substances solides exprimées au paragraphe 7. De plus, les mélanges qui contiennent des substances présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa qui ne se dissolvent pas dans l'huile minérale, ou qui ne forment pas de suspension stable pendant une durée d'au moins 5 minutes, ne sont pas considérés actuellement comme faisant partie du domaine d'applicabilité de la méthode d'essai, et peuvent générer des résultats faux négatifs.

9. La méthode d'essai STE ne peut être utilisée pour l'identification de produits chimiques relevant des catégories 2, 2A (irritation oculaire) ou 2B (légère irritation oculaire) du SGH de l'ONU, en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU sous-évalués dans les catégories 2, 2A ou 2B, du SGH de l'ONU, et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU surévalués dans les catégories 2, 2A ou 2B (7). Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.

10. La méthode d'essai STE convient pour des produits chimiques d'essai dissous ou en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5 % dans une solution saline, ou dans une huile minérale. La méthode d'essai STE ne convient pas pour des produits chimiques insolubles ou qui ne peuvent pas être en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, dans du DMSO à 5% en solution saline, ou dans une huile minérale (voir paragraphe 17 pour des choix de solvants). L'utilisation d'une huile minérale dans la méthode d'essai STE est possible car il s'agit d'une exposition de courte durée. En conséquence, la méthode d'essai STE convient pour prévoir le potentiel de dangerosité pour les yeux de produits chimiques testés insolubles dans l'eau (alcools gras à longue chaîne ou cétones, par exemple), à condition que ces produits chimiques soient solubles dans au moins l'un des trois solvants proposés ci-avant (4).

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. La méthode d'essai STE est un test *in vitro* de cytotoxicité, réalisé sur une monocouche confluente de fibroblastes de cornée de lapin du Statens Seruminstitut (SIRC), cultivés sur des plaques microtitres 96 puits (4). Après 5 minutes d'exposition à un produit chimique testé, on détermine quantitativement la cytotoxicité en mesurant, à l'aide du test MTT (4), la viabilité relative des cellules SIRC. L'observation d'une diminution de la viabilité cellulaire est utilisée pour prédire les effets indésirables potentiels pouvant provoquer des lésions oculaires.

12. Il a été signalé que 80 % d'une solution appliquée sur l'œil d'un lapin est excrétée via le sac conjonctival dans les trois à quatre minutes, tandis que plus de 80 % d'une solution appliquée sur l'œil humain est excrétée en une à deux minutes (10). La méthode d'essai STE vise à s'approcher de ces durées d'exposition et prend comme effet mesuré la cytotoxicité pour évaluer les lésions subies par les cellules SIRC après cinq minutes d'exposition au produit chimique testé.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai STE décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les onze substances recommandées au tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées pour représenter l'ensemble de la gamme des réponses correspondant à des lésions oculaires graves ou à une irritation oculaire, sur la base des résultats obtenus *in vivo* avec le test sur œil de lapin (LD 405) et du système de classification SGH de l'ONU (1). La disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et l'existence de données de bonne qualité issues de la méthode d'essai STE *in vitro* constituent d'autres critères de sélection (3). Si un des produits chimiques de la liste n'est pas disponible ou si cela se justifie, on pourra utiliser un autre produit chimique pour lequel des données de références acceptables *in vitro* et *in vivo* sont disponibles, à condition de retenir les mêmes critères que ceux retenus dans la présente Ligne directrice.

Tableau 1 : Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence

Substance	Numéro CAS	Classe chimique ¹	État physique	Cat. SGH ONU In Vivo ²	Solvant dans essai STE	Cat. SGH ONU STE
Chlorure de benzalkonium (10 %, aqueux)	8001-54-5	Composé onium	Liquide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éther	Liquide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Acid Red 92	18472-87-2	Hétérocycle; Hydrocarbure bromé; Composés du chlore	Solide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Hydroxyde de Sodium	1310-73-2	Alcali; Substance inorganique	Solide	Catégorie 1 ³	Solution saline	Catégorie 1
Butyrolactone	96-48-0	Lactone; Hétérocycle	Liquide	Catégorie 2A	Solution saline	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
Octan-1-ol	111-87-5	Alcool	Liquide	Catégorie 2A/B ⁴	Huile minérale	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
Cyclopentanol	96-41-3	Alcool; Hydrocarbure, cyclique	Liquide	Catégorie 2A/B ⁵	Solution saline	Aucune prédiction définitive ne peut être faite
Acétate de 2-éthoxyéthyl	111-15-9	Alcool; Éther	Liquide	Sans Catégorie	Solution saline	Sans Catégorie
Dodécane	112-40-3	Hydrocarbure, acyclique	Liquide	Sans Catégorie	Huile minérale	Sans Catégorie

Méthylisobutylcétone	108-10-1	Cétone	Liquide	Sans Catégorie	Huile minérale	Sans Catégorie
Glycerol	56-81-5	Alcool	Liquide	Sans Catégorie	Solution saline	Sans Catégorie

Abréviations : Numéro CAS = Numéro d'enregistrement auprès du Chemical Abstracts

¹Les classes chimiques ont été déterminées d'après les informations obtenues dans les publications antérieures du NICEATM ou, si celles-ci étaient indisponibles, auprès de la National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponible à l'adresse <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) et avec la détermination des structures du NICEATM.

²Basé sur les résultats obtenus avec le test in vivo sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) et sur le SGH de l'ONU (1).

³La classification dans la catégorie 1 est fondée sur le potentiel corrosif pour la peau d'une solution d'hydroxyde de sodium à 100 % (sur la liste des produits chimiques d'épreuve potentiellement corrosifs pour la peau dans la LD 435 de l'OCDE) et sur les critères de classification en catégorie 1 du SGH de l'ONU (1).

⁴La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 2 animaux sur 6 ou 4 animaux sur 6 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. Les données in vivo sont issues de 2 études menées chacune sur 3 animaux. Dans une étude, des effets étaient encore visibles chez deux des trois animaux le septième jour, d'où le classement en catégorie 2A (11), tandis que dans la seconde étude tous les effets mesurés chez les trois animaux avaient disparu le septième jour, d'où le classement en catégorie 2B (12).

⁵La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 animal sur 3 ou 2 animaux sur 3 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude in vivo a été menée sur 3 animaux. Tous les effets, sauf l'opacité de la cornée et la rougeur conjonctivale chez un animal, avaient disparu le septième jour ou avant. L'animal dont les effets n'avaient pas disparu le septième jour présentait un score d'opacité cornéenne de 1 et un score pour la rougeur conjonctivale de 1 le septième jour, et les deux effets avaient disparu au quatorzième jour (11).

PROCÉDURE

Préparation de la monocouche cellulaire

14. La lignée cellulaire de cornée de lapin SIRC est utilisée dans la méthode d'essai STE. Il est recommandé d'acquérir les cellules SIRC auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple la lignée CCL60 auprès de l'American Type Culture Collection.

15. Les cellules SIRC sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO₂, dans un flacon contenant un milieu de culture constitué de milieu essentiel minimal d'Eagle (MEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 50-100 unités/mL de pénicilline et 50-100 µg/mL de streptomycine. Les cellules devenues confluentes dans le flacon de culture doivent être séparées à l'aide d'une solution de trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique, avec ou sans raclette.

Les cellules sont repiquées dans un flacon de culture (par exemple, 2 ou 3 repiquages) avant d'être utilisées dans les tests de routine et ne doivent pas être utilisées après plus de 25 repiquages après décongélation.

16. Les cellules prêtes à être utilisées dans l'essai STE sont préparées à la densité adaptée etensemencées dans une plaque microtitre 96 puits. La densité d'ensemencement recommandée est de 6.0×10^3 cellules par puits lorsque les cellules sont utilisées quatre jour après l'ensemencement, ou 3.0×10^3 cellules par puits lorsque les cellules sont utilisées cinq jours après l'ensemencement, pour un volume de culture de 200 μL . Les cellules utilisées dans le test STEensemencées dans un milieu de culture à la densité adéquate atteignent une confluence supérieure à 80 % au moment de l'essai, c'est-à-dire quatre ou cinq jours après l'ensemencement. Pour les substances hautement volatiles (c'est-à-dire ayant une pression de vapeur mesurée supérieure à 6kPa), l'huile minérale est utilisée comme solvant, si le produit chimique d'essai est capable de se dissoudre ou de former une suspension stable pendant au moins 5 minutes dans l'huile minérale.

Application des substances d'essai et de contrôle

17. Il est recommandé de commencer par dissoudre ou suspendre le produit chimique d'essai dans du sérum physiologique. Si le produit chimique d'essai est peu soluble, insoluble ou ne peut pas être mis en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, du DMSO à 5 % (N°CAS 67-68-5) dans une solution saline peut alors être choisi comme solvant. Si le produit chimique ne peut être dissous ou mis en suspension uniforme pendant 5 minutes, soit dans du sérum physiologique, soit dans du DMSO à 5 % dans une solution saline, le troisième solvant possible est une huile minérale (N°CAS 8042-47-5).

18. Les produits chimiques sont dissous ou uniformément suspendus à une concentration de 5 % (m/v) dans le solvant choisi, puis une série de dilutions de facteur 10 est réalisée jusqu'à obtention de concentration à 0.5 % et 0.05 %. Chaque produit chimique est testé aux deux concentrations (5 % et 0.05 %). Les cellules cultivées sur la plaque 96 puits sont exposées à 200 μL /puits de la solution (ou suspension) de produit chimique à 5 %, ou à 0.05 %, pendant 5 minutes à température ambiante. Les produits chimiques (substances mono-constituant, ou substances ou mélanges multi-constituants) sont considérés comme purs et dilués ou suspendus selon la présente méthode, quelle que soit leur degré de pureté.

19. Le milieu de culture décrit au paragraphe 15 est utilisé comme témoin pour chaque plaque de chaque répétition. En outre, les cellules sont aussi exposées, pour chaque plaque de chaque répétition, à des échantillons témoins de solvant. Il a été confirmé que les solvants indiqués au paragraphe 17 n'ont aucun effet indésirable sur la viabilité des cellules SIRC.

20. Dans la méthode d'essai STE, du laurylsulfate de sodium (SLS) à 0.01 % dans une solution physiologique est utilisé comme témoin positif pour chaque plaque de chaque répétition. Afin de calculer la viabilité cellulaire en présence du témoin positif, chaque plaque de chaque répétition comprend aussi un témoin avec une solution physiologique.

21. Un blanc est nécessaire afin de déterminer la compensation de densité optique par la solution tampon, et ne contient que le milieu de culture ou le tampon phosphate en solution physiologique, sans calcium ni magnésium (PBS-) ni cellule.

22. Chaque échantillon (produit chimique d'essai à 5 % ou 0.05 %, témoin avec milieu, témoin avec solvant et témoin positif) est testé avec trois réplicats pour chaque répétition, en exposant les cellules à 200 μL du produit chimique approprié (d'essai ou témoin) pendant cinq minutes à température ambiante.

23. Des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un irritant oculaire dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

Mesures de la viabilité cellulaire

24. Après l'exposition, les cellules sont rincées deux fois dans 200 µL de PBS, puis 200 µL de solution MTT (0.5 mg MTT/mL de milieu de culture) sont ajoutés. Après deux heures de réaction dans un incubateur (37 °C, 5 % CO₂), la décantation de la solution de MTT est effectuée, le MTT formazan est extrait par l'ajout de 200 µL de 40 mM isopropanol-acide chlorhydrique pendant 60 minutes dans le noir à température ambiante, et l'absorbance de la solution de MTT formazan est mesurée à 570 nm avec un lecteur de plaque. Il n'y a interférence entre le produit chimique testé et le MTT (due à des colorants ou à des réducteurs directs du MTT) que si une quantité significative de produit chimique testé perdure dans le système d'essai après le rinçage. Bien que cela soit souvent le cas avec la cornée humaine reconstituée en 3D ou avec les tissus de l'épiderme humain reconstitués, cela est moins susceptible de se produire pour les cultures cellulaires en 2D utilisées dans la méthode d'essai STE. Cependant, du fait que des résidus de produit chimique colorant ou des réducteurs directs du MTT pourraient interférer avec les mesures de densité optique, les utilisateurs de la méthode d'essai doivent évaluer les résultats avec précaution. Si l'essai résulte en une prédiction de Catégorie 1, alors il n'est pas utile de faire quoi que ce soit d'autre concernant les interférences potentielles. Dans la mesure du possible, des données devraient être générées afin de déterminer si de telles interférences se produisent réellement (par exemple en effectuant une expérience pour comparer les mesures de densité optique de l'essai MTT dans les puits traités contenant les cellules SIRC avec les mesures dans les puits traités ne contenant pas de cellules SIRC). Si l'interférence avec le MTT est sensé affecter les résultats, un essai de cytotoxicité alternatif (le rouge neutre par exemple) peut être utilisé, s'il est démontré que qu'il fournit les mêmes résultats que l'essai MTT, au moyen des substances d'épreuve de compétence listées dans le Tableau 1, par exemple, et si les données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptation de l'épreuve comparables (voir paragraphe 29).

Interprétation des résultats et modèle de prévision

25. Les valeurs de densité optique (DO) obtenues pour chaque produit chimique d'essai sont ensuite utilisées pour calculer la viabilité cellulaire exprimée relativement à celle du témoin avec solvant, fixée à 100%. La viabilité cellulaire relative est exprimée en pourcentage et obtenue en divisant la DO du produit chimique testé par la DO du témoin avec solvant, après soustraction de la DO du blanc de chaque valeur.

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{(DO_{570} \text{ produit chimique d'essai}) - (DO_{570} \text{ blanc})}{(DO_{570} \text{ témoin avec solvant}) - (DO_{570} \text{ blanc})} \times 100$$

De même, la viabilité cellulaire de chaque témoin avec solvant est exprimée en pourcentage et s'obtient en divisant la DO de chaque témoin avec solvant par la DO du témoin avec milieu, après soustraction de la DO du blanc de chaque valeur.

26. Trois répétitions indépendantes, chacune contenant trois réplicats (soit 9 puits), sont réalisées. On utilise la moyenne arithmétique des trois puits pour chaque produit chimique d'essai et chaque témoin de solvant dans chaque répétition indépendante pour calculer la moyenne arithmétique de la viabilité cellulaire relative. La moyenne arithmétique finale de la viabilité cellulaire est calculée à partir des trois répétitions indépendantes.

27. Les valeurs seuils de la viabilité cellulaire pour l'identification des produits chimiques testé induisant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« Sans catégorie » du SGH de l'ONU) sont fournies ci-après.

Tableau 2 : Modèle de prédiction de la méthode d'essai STE

Viabilité cellulaire		Classification SGH ONU	Applicabilité
À 5 %	À 0.05 %		
> 70 %	> 70 %	Sans catégorie	Substances et mélanges, à l'exception des produits chimiques (substances et mélanges) solides sauf les tensioactifs et les mélanges composés uniquement de tensioactifs
≤ 70 %	> 70 %	Aucune prédiction définitive ne peut être faite ²	Non applicable
≤ 70 %	≤ 70 %	Catégorie 1	Substances et mélanges ³

¹Les mélanges contenant des substances présentant une pression de vapeur supérieure à 6kPa doivent être analysés avec attention pour éviter toute sous-évaluation, et leur cas doit être justifié un à un.

² Aucune prédiction définitive ne peut être faite à partir de ce résultat pris isolément. Le résultat de l'essai doit être considéré dans le contexte d'une Approche Intégrée pour les Essais et l'Évaluation (14) à des fins de classification.

³Sur la base de résultats obtenus principalement avec des substances mono-constituant, bien que des données limitées soient aussi disponibles pour les essais portant sur des mélanges. L'utilisation de la méthode d'essai est néanmoins techniquement possible pour les substances multi-constituants et pour les mélanges. Cependant, avant d'utiliser la présente Ligne directrice d'essai pour un mélange dans le but de générer des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, cette méthode fournit des résultats adéquats pour l'utilisation souhaitée. Cette vérification n'est pas nécessaire lorsque les essais sur les mélanges sont exigés par la réglementation.

Critères d'acceptabilité

28. L'acceptabilité des résultats de l'essai repose sur les critères suivants :

- La densité optique du témoin avec milieu (exposé au milieu de culture) est supérieure ou égale à 0.3 après soustraction de la densité optique du blanc.
- La viabilité du témoin avec solvant est supérieure ou égale à 80 % par rapport à celle du témoin avec milieu. Lorsque plusieurs témoins avec solvant sont utilisés à chaque répétition, chacun de ces témoins devra démontrer une viabilité cellulaire supérieure à 80 % pour qualifier les produits chimiques quand ceux-ci ont été testés avec ces solvants.
- La viabilité cellulaire obtenue avec le témoin positif (0.01 % SLS) est comprise dans un intervalle de deux écarts-types de la moyenne historique. Les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure pour le témoin positif sont régulièrement

mises à jour, tous les trois mois ou à chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Lorsqu'un laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution de témoins positifs statistiquement robuste, il est acceptable d'utiliser les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure établies au moment de la mise au point de la méthode – soit entre 21.1 % et 62.3 % d'après les données expérimentales historiques – et de déterminer la distribution interne au cours des premiers tests de routine.

Si l'un de ces critères a), b) ou c) n'est pas rempli, une répétition supplémentaire doit être menée.

- d) L'écart-type de la viabilité cellulaire finale pour le produit chimique d'essai, issu de trois répétitions indépendantes, est inférieur à 15 % pour les deux concentrations, 5 % et 0.05 %. Si l'écart-type est supérieur ou égal à 15%, les résultats ne doivent pas être utilisés et trois répétitions supplémentaires doivent être menées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

290. Les données de chaque puits (les valeurs de viabilité cellulaire, par exemple) pour chaque répétition, ainsi que la moyenne générale, l'écart-type et la classification doivent être rapportés.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai et substances témoins

- Substance mono-constituant : identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChi, formule structurale, et/ou autres identifiants ;
- Substance multi-constituants, UVCB et mélange : caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;
- État physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimique 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 ;
- Solubilité pour une période minimale de 5 minutes dans un solvant préalablement choisi (par exemple dissolution ou suspension stable).

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

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- Description de la méthode d'essai utilisée ;
- Lignée cellulaire utilisée et source, nombre de repiquages et degré de confluence des cellules utilisées pour l'essai ;
- Détails de la procédure d'essai utilisée ;
- Nombre de répétitions et de répliqués utilisés ;
- Concentrations de produit chimique testé utilisées (si différente des recommandations) ;
- Justification du choix de solvant pour chaque produit chimique d'essai ;
- Durée d'exposition au produit chimique testé (si différente des recommandations) ;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire ;
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués ;
- Référence à la moyenne et à l'écart-type historiques du témoin positif ;
- Démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou démonstration de performances adéquates répétées dans l'application de la méthode d'essai.

Résultats

- Pour chaque produit chimique testé et substance témoin, et chaque concentration testée, un tableau présente les valeurs de DO individuelles obtenues pour chaque puits (répliquat), la moyenne arithmétique des valeurs de DO pour chaque répétition indépendante, le pourcentage (%) de viabilité cellulaire pour chaque répétition indépendante, ainsi que la moyenne arithmétique finale du pourcentage (%) de viabilité cellulaire et l'écart-type pour les trois répétitions ;
- Résultats pour le témoin avec milieu, le témoin avec solvant et le témoin positif démontrant que les critères d'acceptabilité pour l'étude sont remplis ;
- Description des autres effets observés, y compris la rétention de quantité significative de réducteur direct du MTT ou de substance colorée suite au rinçage après exposition ;
- Classification globale obtenue compte tenu du modèle de prédiction / des critères de décision utilisés.

*Discussion des résultats**Conclusions*

BIBLIOGRAPHIE

1. ONU. (2013). *Système Général Harmonisé de Classification et d'Étiquetage des Produits Chimiques (SGH)*, Cinquième édition révisée, New York & Genève : Publications des Nations Unies. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible à l'adresse : [www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html].
2. Scott L, et al. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace In Vivo Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
3. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
4. Takahashi Y, et al. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
5. Sakaguchi H, et al. (2011). Validation study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
6. Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
7. ICCVAM. (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
8. OCDE. (2012). *Lignes Directrices de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques (No. 405.) : Effet Irritant/Corrosif Aigu sur les Yeux*, Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
9. Saito K, et al. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
10. Mikkelsen TJ, Chrai SS et Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.
11. ECETOC. (1998). *Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank*. Technical report No. 48. (2), Bruxelles, Belgique.
12. Gautheron P, et al. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an In Vitro Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol* 18, 442-449.
13. OCDE. (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No. 34.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris
14. OECD (2017). *Guidance Document on an Integrated Approaches 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..
- 15) Abo T, et al. (2018). Expansion of the applicability domain for highly volatile substances on the Short Time Exposure test method and the predictive performance in assessing eye irritation potential. *J. Toxicol. Sci.*, 43, 407-42

ANNEXE I : DÉFINITIONS

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

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

Catégorie 1 du SGH de l'ONU : voir « Lésions oculaires graves ».

Catégorie 2 du SGH de l'ONU : voir « Irritation oculaire ».

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

DO : densité optique.

Fiabilité : mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire (13).

Irritation oculaire : modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique testé sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec « Effets réversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 2 du SGH de l'ONU » (1).

Lésion oculaire grave : lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec « Effets irréversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 1 du SGH de l'ONU » (1).

Mélange : mélange ou solution composée de deux substances ou plus, qui ne réagissent pas entre elles (1).

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium.

Non classé selon le SGH de l'ONU : produit chimique qui n'est pas classé comme irritant oculaire au sens des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B).

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 définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (10).

Précision : degré de conformité entre les résultats d'une méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Le terme est souvent utilisé indifféremment avec le terme « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (13).

Produit chimique d'essai : Le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé.

Produit chimique : substance ou mélange.

Sensibilité : proportion des substances positives/actives correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (10).

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

Spécificité : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (13).

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

Substance étalon : substance utilisée comme référence dans une comparaison avec un produit chimique testé. Une substance étalon doit présenter les propriétés suivantes : (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables ; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances soumises à l'essai ; (iii) posséder des caractéristiques physiques/chimiques connues ; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus ; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

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

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

Substance : un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition (1).

Taux de faux négatifs : proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs : proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin avec milieu : réplikat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin avec solvant/véhicule : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins, traités ou non avec le produit chimique d'essai, afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

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

Tensioactif : Aussi appelé agent de surface; il s'agit d'un produit chimique, tel qu'un détergent, capable de réduire la tension superficielle d'un liquide et de favoriser ainsi sa capacité à mousser ou à pénétrer les solides ; il est aussi connu comme agent mouillant.

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