



**Section 4**  
Effets sur la santé

## Essai n° 492:

Méthode d'essai sur modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué (echr) pour l'identification de produits chimiques ne nécessitant aucune classification ni étiquetage pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves

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'épithélium cornéen humain reconstruit pour l'identification de produits chimiques ne nécessitant pas de classification et d'étiquetage pour une irritation oculaire ou lésions oculaires graves

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 testé sur la surface antérieure de l'œil et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application. Les produits chimiques testés provoquant des lésions oculaires graves sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU, tandis que ceux provoquant une irritation oculaire sont classés dans la catégorie 2. Les produits chimiques testés 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. Jusqu'à présent, l'évaluation des lésions oculaires graves/irritations oculaires impliquait généralement 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). 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 (IATA en anglais) pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (3).
3. La présente Ligne directrice décrit une procédure *in vitro* permettant l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves, conformément au SGH de l'ONU. Un modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué (EChR) est utilisé, qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques de l'épithélium cornéen humain. Quatre autres méthodes d'essai *in vitro* ont été validées, considérées scientifiquement valides et adoptées en tant que Lignes directrices de l'OCDE [LD 437 (4), 438 (5), 460 (6) et 491 (7)] à utiliser pour évaluer le danger de lésions oculaires graves ou l'absence de classification.

4. Quatre méthodes d'essai validées sont couvertes par la présente Ligne directrice, elles reposent sur un modèle tissulaire d'EChR disponible dans le commerce. Le test d'irritation oculaire (TIO) EpiOcular™, le TIO SkinEthic™ avec épithélium cornéen humain (HCE) et le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ ont été validés dans des études d'évaluation de l'irritation oculaire/lésions oculaires graves (8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15). Ces trois méthodes utilisent comme système d'essai un modèle tissulaire d'EChR disponible dans le commerce, et deux d'entre elles sont désignées ci-après comme Méthodes de référence validées : le TIO EpiOcular™ (MRV1) et le TIO SkinEthic™ HCE (MRV2), respectivement. D'après leurs études de validation et l'examen indépendant par des pairs dont elles ont fait l'objet (10)(13), le TIO EpiOcular™, le TIO HCE SkinEthic™, le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ sont capables d'identifier correctement des produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU (1), et les méthodes ont été jugées scientifiquement valides et recommandées pour cet objectif. Les annexes II à VII résument les éléments importants des méthodes d'essai et présentent des logigrammes avec des instructions adaptées à différentes situations.

5. La(les) méthodes 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 Ligne directrice 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) telle que l'approche « bottom-up/top-down » pourrait remplacer le test de Draize (19). L'approche « bottom-up » est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification, tandis que l'approche « top-down » est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique provoque des lésions oculaires graves. Le TIO EpiOcular™, le TIO HCE SkinEthic™, le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ sont recommandés pour identifier sans expérimentation supplémentaire les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU) (1), dans le cadre d'une approche « bottom-up/top-down » suggérée par Scott et al., par exemple comme première étape d'une approche « bottom-up » ou comme une des étapes finales dans une approche « top-down ». Cependant, le TIO EpiOcular™, le TIO HCE SkinEthic™, le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ ne sont pas conçus pour permettre de faire la distinction entre les produits chimiques de catégorie 1 du SGH de l'ONU (lésions oculaires graves) et ceux de catégorie 2 du SGH de l'ONU (irritation oculaire). Cette distinction doit être faite à une autre étape d'une stratégie par niveaux (3). Un produit chimique identifié comme nécessitant une classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves à l'aide du TIO EpiOcular™, du TIO HCE SkinEthic™ du TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou du TIO MCTT HCE™ devrait être soumis à des essais complémentaires (in vitro et/ou in vivo) visant à tirer une conclusion définitive (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU, catégorie 1 ou catégorie 2), en utilisant, par exemple, les LD 437, 438, 460, 491, ou en dernière option la LD 405.

6. L'objectif de la présente Ligne directrice est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique testé présente pour l'œil en se fondant sur sa capacité à provoquer une cytotoxicité sur un modèle tissulaire d'EChR, mesurée par le test de coloration au tétrazolium (CT ; par exemple, MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium ; numéro CAS 298-93-1] pour les MRV1 et MRV2, WST-8 [2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium, sel monosodium ; numéro CAS 193149-74-5] pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou WST-1[4[354-Iodophényl]-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène disulfonate ; CAS RN 150849-52-8] pour le TIO MCTT HCE™ EIT} ( (20)(21)(22)(voir paragraphe 23). La

viabilité du tissu d'EChR après exposition à un produit chimique testé est déterminée par comparaison avec celle de tissus traités avec la substance servant de témoin négatif (% de viabilité) puis utilisée pour prédire le danger potentiel du produit chimique testé pour les yeux.

7. Des normes de performance (20) permettent de simplifier la validation de méthodes d'essai in vitro nouvelles ou modifiées utilisant l'EChR et similaires au TIO EpiOcular™, au TIO HCE SkinEthic™ et au TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et LE tio MCTT HCE™EIT, conformément aux principes énoncés dans le Document d'orientation n° 34 (24), et de modifier rapidement la présente Ligne directrice pour y intégrer lesdites méthodes. L'acceptation mutuelle des données (AMD) ne sera garantie que pour les méthodes d'essai validées selon les normes de performance, si ces méthodes d'essai ont été examinées et ajoutées à la présente Ligne directrice par l'OCDE.

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

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. La présente Ligne directrice se base sur un modèle tissulaire tridimensionnel d'EChR disponible dans le commerce et produit à partir de kératinocytes primaires de l'épiderme humain (le modèle EpiOcular™ OCL-200), à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées (le TIO HCE/S SkinEthic™) ou à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines primaires (le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou MCTT HCE™). Les modèles tissulaires d'EChR EpiOcular™ OCL-200, HCE/S SkinEthic™, et LabCyte CORNEA-MODEL24 et MCTT HCE™ sont fidèles à la structure tridimensionnelle de l'épithélium cornéen in vivo et produits à partir de cellules de l'espèce cible (25)(26)(27)(28). En outre, ces méthodes d'essai mesurent directement la cytotoxicité due à la pénétration transcornéenne du produit chimique et la production de lésions cellulaires et tissulaires après exposition de l'œil à un produit chimique, ce qui permet d'évaluer la réponse globale d'irritation oculaire/de lésion oculaire grave in vivo. Les lésions cellulaires peuvent être causées par plusieurs mécanismes d'action (voir paragraphe 22), 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 la chémosis conjonctivale, quels que soient les processus physico-chimiques sous-jacents des lésions tissulaires.

10. Un large éventail de produits chimiques, représentant de nombreux types et classes chimiques, poids moléculaires, LogP, structures chimiques, etc., a été testé dans l'étude de validation sur laquelle s'appuie la présente Ligne directrice. La base de données de validation du TIO EpiOcular™ comprenait un total de 113 produits chimiques, couvrant 95 groupes fonctionnels organiques différents d'après une analyse de l'OCDE effectuée à l'aide de la boîte à outils QSAR (9). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances mono-constituant, mais plusieurs substances multi-constituants étaient aussi incluses dans l'étude (dont 3 homopolymères, 5 copolymères et 10 quasi-polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU, les 113 produits chimiques testés étaient répartis comme suit : 13 liquides de catégorie 1, 15 solides de catégorie 1, 6 liquides de catégorie 2A, 10 solides de catégorie 2A, 7 liquides de catégorie 2B, 7 solides de catégorie 2B, 27 liquides sans catégorie et 28 solides sans catégorie (10)(8). La base de données de validation du TIO HCE SkinEthic™ comprenait un total de 200 produits chimiques, couvrant 165 groupes fonctionnels organiques différents (9)(11)(12). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances mono-constituant, mais plusieurs substances multi-constituants étaient aussi incluses dans l'étude (dont 10 polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU, les 200 produits chimiques testés étaient répartis comme suit : 27 liquides de catégorie 1, 24 solides de catégorie 1, 19 liquides de catégorie 2A, 10 solides de catégorie 2A, 9 liquides de catégorie 2B, 8 solides de catégorie 2B, 50 liquides sans catégorie et 53 solides sans catégorie (11)(12). La base de

données de validation accélérée du TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 contenait 30 produits chimiques de référence qui sont énumérés dans les normes de performance (20) de la présente Ligne directrice 492. La base de données du TIO MCTT HCE™ test de validation similaire contenait 30 substances chimiques de référence listées dans les normes de performances (23) de la présente directive LD 492.

11. 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. Si possible, les solides sont moulus finement avant application ; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et aérosols n'ont pas fait l'objet d'une étude de validation. Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à l'EChR, l'actuelle Ligne directrice ne permet pas de tester les produits de ce type. Lors de l'examen des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester (p. ex., instables) ou des produits chimiques d'essai qui ne relèvent pas clairement du domaine d'applicabilité décrit dans la présente directive, il convient de tenir compte de la question de savoir si les résultats de ces essais donneront des résultats scientifiquement significatifs. De telles considérations ne sont pas nécessaires, lorsqu'il existe une prescription réglementaire pour les essais du mélange

12. Les produits chimiques testés qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le colorant formazan (CF, naturellement ou après traitement) et les produits chimiques testés pouvant directement réduire le colorant vital CT (en CF) 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 testé et de la procédure employée pour mesurer quantitativement chaque CF (voir paragraphes 38-44).

13. Les résultats issus des études de pré-validation (30)(31)(32) et de validation (9)(11)(12)(14)(15) ont démontré que le TIO EpicOcular™, le TIO SkinEthic™ HCE, le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ peuvent être menés par des laboratoires n'ayant jamais réalisé cet essai auparavant et qu'ils sont reproductibles au sein des laboratoires et entre laboratoires. D'après ces études, sur la base des données relatives à 113 produits chimiques, le taux de reproductibilité attendu pour le TIO EpiOcular™ en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 95 % au sein des laboratoires et de 93 % entre laboratoires. Sur la base de données relatives à 120 produits chimiques, le taux de reproductibilité attendu pour le TIO HCE SkinEthic™ en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 92 % au sein des laboratoires et de 95 % entre laboratoires. Sur la base de données relatives à 30 produits chimiques énumérés dans les normes de performance (22), le taux de reproductibilité attendu pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 96 % au sein des laboratoires et de 87 % entre laboratoires. Le niveau de reproductibilité en terme de concordance des prédictions que l'on peut espérer du TIO MCTT HCE™, à partir de 30 références listées dans les normes de performances, est de l'ordre de 93% au sein des laboratoires et de 90% entre les laboratoires.

14. Le TIO EpiOcular™ peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU (1). D'après les données obtenues dans l'étude de validation (9), le TIO EpiOcular™ présente une précision globale de 80 % (sur 112 produits chimiques), une sensibilité de 96 % (sur 57 produits chimiques), un taux de faux négatifs de 4 % (sur 57 produits chimiques), une spécificité de 63 % (sur 55 produits chimiques) et un taux de faux positifs de 37 % (sur 55 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)(18) et classées selon le SGH de l'ONU (1). Dans une étude testant 97 formulations liquides de produits agrochimiques, une performance similaire à celle démontrée dans l'étude de validation a été obtenue avec la méthode du TIO EpiOcular™ pour ce type de mélanges (33). Les 97 formulations étaient réparties comme suit : 21 en catégorie 1, 19 en catégorie 2A, 14 en catégorie 2B et 43 sans catégorie, selon le SGH de l'ONU (1) et sur la base des données de référence obtenues avec le test in vivo sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) (2)(18). Une précision globale

de 82 % (sur 97 formulations), une sensibilité de 91 % (sur 54 formulations), un taux de faux négatifs de 9 % (sur 54 formulations), une spécificité de 72 % (sur 43 formulations) et un taux de faux positifs de 28 % (sur 43 formulations) ont été obtenus (33).

15. Le TIO HCE SkinEthic™ peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU (1). D'après les données obtenues dans l'étude de validation (11)(12), le TIO HCE SkinEthic™ présente une précision globale de 84 % (sur 200 produits chimiques), une sensibilité de 95 % (sur 97 produits chimiques), un taux de faux négatifs de 5 % (sur 97 produits chimiques), une spécificité de 72 % (sur 103 produits chimiques) et un taux de faux positifs de 28 % (sur 103 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 classées selon le SGH de l'ONU (1).

16. Le TIO LabCyte CORNEA-MODEL peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU (1). D'après les données obtenues dans l'étude de validation accélérée (15), le TIO LabCyte CORNEA-MODEL remplit les critères de reproductibilité et de capacité de reproduction exigés par les normes de performance de cette Ligne directrice (20). En outre, 139 produits chimiques composant une base de données ont été testés par le développeur du modèle tissulaire (données non publiées).

17. Le TIO MCTT HCE™ peut être utilisé pour identifier les produits chimiques qui ne requièrent pas de classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le système de classification SGH de l'ONU (1). Compte tenu des données obtenues dans l'étude de validation de rattrapage (15), le MCTT HCE™ EIT répond aux critères de reproductibilité et de capacité prédictive, comme l'exigent les normes de performance de la présente ligne directrice (23). En outre, un ensemble composé de 141 produits chimiques a été testé (15), ce qui a montré que le TIO MCTT HCE™ a une exactitude globale de 86% (basé sur 141 produits chimiques), une sensibilité de 99% (basée sur 80 produits chimiques), un taux négatif faux de 1% (basé sur 80 produits chimiques), une spécificité de 69% (basé sur 61 produits chimiques) et UN taux de faux positifs de 31% (basé sur 61 produits chimiques), comparativement aux données de référence in vivo sur les tests oculaires de lapin (OCDE TG 405) (2) (18) classées selon le système de classification des Nations Unies SGH (1).

18. Les taux de faux positifs obtenus avec ces méthodes d'essai sur EChR pour les substances et les mélanges sont conformes à la variabilité inhérente de 12 % constatée dans le cadre du test oculaire in vivo de Draize (34). Les taux de faux positifs obtenus avec chacune des méthodes d'essai sur EChR pour les substances et les mélanges ne sont pas préoccupants dans le contexte de la présente LD, étant donné que tous les produits chimiques testés provoquant une viabilité tissulaire inférieure ou égale aux seuils définis (voir paragraphe 46) feront ensuite l'objet d'un autre (d'autres) essai(s) in vitro selon les Lignes directrices appropriées, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, conformément au Document d'Orientations de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (3). Ces méthodes d'essai peuvent être utilisées pour tous les types de produits chimiques, un résultat négatif pouvant être accepté pour ne pas classer un produit chimique pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU). Il y a lieu de consulter les autorités réglementaires compétentes avant de mettre en œuvre le TIO EpiOcular™, le TIO HCE SkinEthic™ le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ dans un système de classification autre que le SGH de l'ONU.

19. Une limite de cette Ligne directrice est qu'elle ne permet pas de distinguer les produits chimiques produisant une irritation oculaire ou des effets réversibles sur l'œil (catégorie 2) de ceux entraînant des lésions oculaires graves ou des effets irréversibles sur l'œil (catégorie 1), ni les produits irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2A) de ceux modérément irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2B), tels que définis

dans le SGH de l'ONU (1). Pour établir cette distinction, des essais *in vitro* supplémentaires comme énoncé dans le document d'orientation de l'OCDE sur une approche intégrée pour les tests et l'évaluation des lésions oculaires graves et des irritations oculaires sont nécessaires (3).

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

## PRINCIPE DE L'ESSAI

21. Le produit chimique testé 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-traitement. Les tissus d'épithélium cornéen humain sont reconstitués à partir de kératinocytes épidermiques humains primaires, de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées ou de cellules épithéliales cornéennes humaines primaires, cultivés pendant plusieurs jours jusqu'à la formation d'un épithélium stratifié, hautement différencié et morphologiquement semblable à l'épithélium cornéen humain. Le modèle tissulaire d'EChR EpiOcular™, LabCyte CORNEA-MODEL24 et MCTT HCE™ est constitué d'au moins trois couches cellulaires viables et d'une surface non kératinisée présentant une structure similaire à celle de la cornée *in vivo* (27). Le modèle tissulaire d'EChR HCE 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 (26)(35).

22. 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, l'iritite et la rougeur et/ou la chémosis conjonctivales, 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)(36)(37). 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 physico-chimiques sous-jacents des lésions tissulaires (38)(39). En outre, le pouvoir de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'un produit chimique est déterminé principalement par l'ampleur de la lésion initiale (36), laquelle est corrélée avec l'étendue de la mort cellulaire (38) et à l'ampleur des effets et conséquences éventuelles qui en découlent (40)(41)). Par conséquent, les produits faiblement irritants n'ont en général d'effet que sur l'épithélium superficiel 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 cornéen (39)(42). On mesure la viabilité du tissu d'EChR après exposition locale à un produit chimique testé 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.

23. La viabilité tissulaire de l'EChR est mesurée via la conversion enzymatique du CT (MTT pour les MRV1 et MRV2, WST-8 pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou le TIO MCTT HCE™) par les cellules viables du tissu en CF coloré (formazan bleu pour le MTT ou formazan jaune pour le WST-8 et WST-1). Le formazan bleu est mesuré quantitativement après son extraction des tissus (20), tandis que le formazan jaune n'a pas besoin d'être extrait étant donné sa solubilité dans l'eau et est mesuré quantitativement directement à partir de la solution du WST-8 ou WST-1 sur laquelle les tissus sont mis en incubation au cours du test WST-8(21) ou WST-1 (22) (22). Les produits chimiques qui ne relèvent d'aucune classification dans le SGH de l'ONU (« sans catégorie ») sont ceux qui ne provoquent pas une diminution de la viabilité tissulaire en deçà d'un seuil défini (à savoir, viabilité tissulaire > 60 % avec le TIO EpiOcular™ et le TIO SkinEthic™ HCE ; > 50 % avec le TIO SkinEthic™ HCE ; ou > 40 % avec le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou > 35% pour les liquides et > 60% pour les solides dans le TIO MCTT HCE™ (voir paragraphe 46).

## DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

24. Avant d'appliquer en routine les méthodes d'essai sur EChR à des fins réglementaires, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les quinze produits chimiques d'épreuve recommandés au tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés parmi ceux utilisés lors de l'étude de validation des MRV1 et MRV2 (9)(11)(12). 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, 2A, 2B ou « sans catégorie ») (1) ; (iii) couvrent les différents critères de classification in vivo (34)(43) ; (iv) sont représentatifs des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation (9)(11)(12) ; (v) couvrent un large spectre de groupes fonctionnels organiques (9)(11)(12) ; (vi) ont une structure chimique bien définie (9)(11)(12) ; (vii) sont colorés et/ou sont des réducteurs directs du CT ; (viii) ont donné des résultats reproductibles lors de la validation des méthodes d'essai sur EChR ; (ix) ont été classés correctement lors de la validation des méthodes d'essai sur EChR ; (x) couvrent la gamme complète des réponses in vitro d'après des données de haute qualité issues des méthodes d'essai sur EChR (viabilité 0-100 %) ; (xi) sont disponibles dans le commerce ; et (xii) 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 des MRV. Ces changements doivent cependant être justifiés.

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

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique <sup>1</sup>	État physique	Viabilité MRV1 (%) <sup>2</sup>	Viabilité MRV2 (%) <sup>3</sup>	Viabilité LabCyte (%) <sup>3-1</sup>	MCTT HCE™ viabilité <sup>3-2</sup>	Prédiction MRV	Interférence couleur
<i>In Vivo</i> Catégorie 1 <sup>4</sup>									
Méthylthioglycolate	2365-48-2	Ester d'acide carboxylique ; Thioalcool	L	10.9±6.4	5.5±7.4	1.7±1.2	25.3±6.0)	Aucune prédiction possible	N
Acrylate d'hydroxyétyle	818-61-1	Acrylate ; Alcool	L	7.5±4.75 <sup>5</sup>	1.6±1.0	7.5±4.75	9.8±7.7	Aucune prédiction possible	N
2,5-Diméthyl-2,5-hexanédiol	110-03-2	Alcool	S	2.3±0.2	0.2±0.1	2.8±2.6	0.5±0.1	Aucune prédiction possible	N
Oxalate de sodium	62-76-0	Acide oxocarboxylique	S	29.0±1.2	5.3±4.1	3.7±1.5	30.6±6.3	Aucune prédiction possible	N
<i>In Vivo</i> Catégorie 2A <sup>4</sup>									
Acide D-gluconique, composé avec N,N''-bis(4-chlorophényl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tétraazatétradécane diazidine (2:1) (20 %, aqueux) <sup>6</sup>	18472-51-0	Halogénure aromatique hétérocyclique ; Halogénure d'aryle ; Groupe dihydroxyle ; Guanidine	L	4.0±1.1	1.3±0.6	0.4±0.4	1.8±0.1	Aucune prédiction possible	O (faible)
Benzoate de sodium	532-32-1	Aryle ; Acide carboxylique	S	3.5±2.6	0.6±0.1	2.9±2.6	1.1±0.5	Aucune prédiction possible	N
<i>In Vivo</i> Catégorie 2B <sup>4</sup>									
Diéthyl-toluamide	134-62-3	Benzamide	L	15.6±6.3	2.8±0.9	32.4±9.3	2.3±2.2	Aucune prédiction possible	N
2,2-Diméthyl-3-méthylènebicyclo [2.2.1] heptane	79-92-5	Alcane, ramifié avec carbone tertiaire ; Alcène ; Bicycloheptane ; Composés carbocycliques pontés ; Cycloalcane	S	4.7±1.5	15.8±1.1	2.2±2.6	22.9±11.5	Aucune prédiction possible	N
<i>In Vivo</i> Sans Catégorie <sup>4</sup>									
1-Éthyl-3-méthylimidazolium éthylsulfate	34257-3-75-5	Alcoxyle ; Sel d'ammonium ; Aryle ; Imidazole ; Sulfate	L	79.9±6.4	79.4±6.2	48.0±8.9	56.8±3.4	Sans Cat	N
Éther dicaprylyle	629-82-3	Alcoxyle ; Éther	L	97.8±4.3	95.2±3.0	92.7±5.0	89.9±8.9	Sans Cat	N
Butoxyde de pipéronyle	51-03-6	Alcoxyle ; Benzodioxole ; Benzyle ; Éther	L	104.2±4.2	96.5±3.5	95.6±14.0	82.4±14.5	Sans Cat	N
Polyéthylène glycol (PEG-40) Huile de ricin hydrogénée	61788-85-0	Acylal ; Alcool ; Allyle ; Éther	Vis-queux	77.6±5.4	89.1±2.9	62.6±11.5	72.1±14.8	Sans Cat	N
1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl)urée	101-20-2	Halogénure aromatique hétérocyclique ; Halogénure d'aryle ; Dérivés de l'urée	S	106.7±5.3	101.9±6.6	77.8±9.0	94.5±5.9	Sans Cat	N
2,2'-méthylènebis(6-(2H-benzotriazol2-yl)-4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol)	10359-7-45-1	Alcane ramifié avec carbone quaternaire ; Composé aromatique polycyclique ; Hétérocycles saturés polycycliques ; Précurseur de quinone ; tert-Butyle	S	102.7±13.4	97.7±5.6	90.2±5.8	98.8±10.1	Sans Cat	N

Tétrafluoroborate de potassium	de	14075-53-7	Sels inorganiques	S	88.6±3.3	92.9±5.1	66.6±0.2	90.5±6.3	Sans Cat	N
--------------------------------	----	------------	-------------------	---	----------	----------	----------	----------	----------	---

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement dans le Chemical Abstracts Service ; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (1) ; MRV1 = Méthode de référence validée, à savoir le TIO EpiOcular™ ; MRV2 = Méthode de référence validée, à savoir le TIO HCE SkinEthic™ ; Interférence couleur = interférence de couleurs avec la mesure de l'absorbance (densité optique, DO) du CF.

<sup>1</sup> Groupes fonctionnels organiques déterminés d'après une analyse emboîtée de l'OCDE avec la Boîte à outils (9).

<sup>2</sup> Sur la base des résultats obtenus avec le TIO EpiOcular™ dans l'étude de validation des méthodes d'évaluation de l'irritation oculaire de l'EURL ECVAM/Cosmetics Europe (9).

<sup>3</sup> Sur la base des résultats obtenus avec le TIO HCE SkinEthic™ dans l'étude de validation (11)(12).

<sup>3-1</sup> Sur la base des résultats obtenus avec le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 dans l'étude de validation (15).

<sup>3-2</sup> Sur la base des résultats obtenus avec le TIO MCTT HCE™ dans l'étude de validation (15)

<sup>4</sup> Sur la base des résultats obtenus avec le test in vivo sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) (2)(18) et le SGH de l'ONU (1).

<sup>5</sup> Sur la base des résultats obtenus avec l'étude suivant la stratégie du Consortium CEFIC pour les tests d'irritation oculaire in vitro (CON4EI).

<sup>6</sup> La 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 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 le septième jour, et l'effet avait disparu au neuvième jour.

<sup>7</sup> Prédiction MRV : voir paragraphe 46 pour l'interprétation du model de prédiction.

25. 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 27, 29 et 32). 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.

## PROCÉDURE

26. Les méthodes d'essai actuellement couvertes par la présente Ligne directrice sont les méthodes scientifiquement valides TIO EpiOcular™, TIO SkinEthic™ HCE, TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et TIO MCTT HCE™ (10)(13)(14)(15), dont les deux premières sont désignées Méthodes de référence validées (MRV1 et MRV2 respectivement). Les modes opératoires de référence pour les méthodes EChR sont disponibles et doivent être suivis lors de la mise en œuvre et de l'emploi des méthodes d'essai en laboratoire

(44)(45)(46)(47). Les paragraphes qui suivent et l'annexe II décrivent les principaux éléments et procédures des méthodes d'essai sur EChR.

## ÉLÉMENTS DES MÉTHODES D'ESSAI ECHR

### *Conditions générales*

27. 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. Le modèle d'épithélium cornéen reconstitué comporte plusieurs couches viables de cellules épithéliales non kératinisées. Le modèle d'EChR présente une surface épithéliale en contact direct avec l'air, de façon à permettre une application locale directe des produits chimiques testés 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 Triton X-100 ou le dodécylsulfate de sodium (SDS). La fonction de barrière devra être démontrée et peut être évaluée en déterminant soit la durée d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité tissulaire de 50 % (TE50) après application de la substance étalon à une concentration fixe déterminée (par exemple, 50-100 µL de Triton X-100 à 0.3 % (v/v), par exemple), soit la concentration nécessaire pour réduire la viabilité tissulaire de 50 % (CI50) après application de la substance étalon pendant une durée d'exposition fixée (30 minutes de traitement avec 50 µL de SDS ou 60 minutes de traitement avec 25 µL de SDS, par exemple) (voir paragraphe 32). Le modèle d'EChR présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que le produit chimique testé 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 d'EChR sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmatique ou mycosique. Le fournisseur vérifie la stérilité du modèle tissulaire et l'absence de contamination mycosique ou bactérienne.

### *Conditions fonctionnelles*

#### *Viabilité*

28. La viabilité est mesurée au moyen du test au colorant de tétrazolium (CT)(MTT avec les MRV1 et MRV2, WST-8 avec le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou WST-1 pour le TIO MCTT HCE™) (19)(21). Dans les cellules viables du modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan, qui est ensuite extrait du tissu avec de l'isopropanol (ou un solvant semblable). Ou bien, le colorant vital WST-8 ou WST-1 est réduit dans les cellules viables du modèle d'EChR en un précipité jaune de formazan soluble dans l'eau. Le colorant formazan (CF) extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance (densité optique, DO), soit suivant une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (42). La DO de la solution de blanc seule (c'est-à-dire le solvant d'extraction pour le test MTT ou le milieu WST-8 dilué pour le test WST-8 ou le milieu dilué WST-1 pour le test WST-1) doit être suffisamment faible, c'est-à-dire < 0.1. Les utilisateurs du modèle d'EChR 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 pour les MRV, LabCyte CORNEA-MODEL24 et MCTT HCE™ sont précisées au tableau 2. Les utilisateurs de la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie utilisent la plage de DO du

témoin négatif fournie au tableau 2 comme critère d’acceptabilité pour le témoin négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités avec le 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 qualité des lots de tissu, mais dans ce cas les critères d’acceptabilité applicables sont différents de ceux spécifiés au tableau 2. 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 qualité) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d’EChR.

**Tableau 2. Plages d’acceptabilité pour la DO du témoin négatif (pour les utilisateurs de la méthode**

Méthode d’essai	Valeur limite inférieure d’acceptation	Valeur limite supérieure d’acceptation
<b>TIO EpiOcular™ (OCL-200) – MRV1 (protocoles pour les liquides et les solides)</b>	> 0.8 <sup>1</sup>	< 2.8
<b>TIO HCE SkinEthic™ (HCE/S) – MRV2 (protocoles pour les liquides et les solides)</b>	>1.0	≤ 2.5
<b>TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 (protocoles pour les liquides et les solides)</b>	≥0.5	≤1.6
<b>TIO MCTT HCE™</b>	≥1.6	≤ 3.0

(pour protocoles impliquant les liquides et les solides )

<sup>1</sup>Cette plage d’acceptabilité prend en compte la possibilité d’allonger la durée de transport/stockage (> 4 jours, par exemple), dont il a été démontré qu’elle n’a pas d’incidence sur le bon déroulement de la méthode d’essai (43).

*Fonction de barrière*

29. 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 TE50 (Triton X-100) ou par la CI50 (SDS), par exemple (tableau 3). La fonction de 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 32).

*Morphologie*

30. L’examen histologique du modèle d’EChR doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l’épithélium cornéen humain (comprenant au moins 3 couches de cellules épithéliales viables et une surface non kératinisée). Pour les trois méthodes d’essai, une morphologie adéquate a été démontrée par le développeur/fournisseur et il n’est donc pas nécessaire de la démontrer à nouveau chaque fois qu’un utilisateur fait usage d’un lot.

*Reproductibilité*

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

*Contrôle de qualité*

32. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'EChR garantisse et démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 28) et à la fonction de barrière (paragraphe 29). Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour la fonction de barrière telle que mesurée avec le TE<sub>50</sub> ou la CI<sub>50</sub> (voir paragraphes 26 et 28) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EChR. La plage d'acceptabilité pour les valeurs TE<sub>50</sub> et CI<sub>50</sub> retenues par le développeur/fournisseur des lots de tissu d'EChR (utilisés dans les méthodes d'essai), lors du contrôle de qualité, est donnée au tableau 3. Le développeur/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 pour les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU.

**Tableau 3. Critères de contrôle de qualité des lots**

Méthode d'essai	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
TIO EpiOcular™ (OCL-200) - MRV1 (100 µL de Triton X-100 à 0.3 % (v/v))	TE <sub>50</sub> = 12.2 minutes	TE <sub>50</sub> = 37.5 minutes
TIO HCE SkinEthic™ (HCE/S) – MRV2 (traitement de 30 min avec 50 µL de SDS)	CI <sub>50</sub> = 1.0 mg/mL	CI <sub>50</sub> = 3.2 mg/mL
TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 – (traitement de 60 min avec 25 µL de SDS)	CI <sub>50</sub> = 1.0 mg/mL	CI <sub>50</sub> = 4.0 mg/mL
TIO MCTT HCE™ (50 µL de Triton X-100 à 0.3% (v/v))	TE <sub>50</sub> = 17.6 minutes	TE <sub>50</sub> = 41.0 minutes

***Application des produits chimiques testés et témoin***

33. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par produit chimique testé et par substance témoin dans chaque épreuve. Deux protocoles de traitement différents sont employés pour les produits chimiques testés liquides et pour les produits chimiques testés solides (44)(45)(46)(47). Pour les deux MRV, avant d'être exposée à un produit chimique testé, la surface des modèles tissulaires est pré-traitée avec du tampon phosphate salin de Dulbecco sans calcium et sans magnésium (DPBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), pour reproduire le plus fidèlement possible les conditions d'humidité de l'œil humain. Les tissus sont traités avec le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) ou avec les substances témoin. Dans tous les protocoles des deux MRV et du TIO MCTT HCE™, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique testé ou de substance témoin pour recouvrir uniformément la surface épithéliale sans pour autant utiliser une dose infinie (voir paragraphes 34 et 35) (annexe II).

34. Les produits chimiques testés 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 les quatre méthodes d'essai. Dans le cas contraire, ils sont considérés comme des solides (voir paragraphe 34). Dans les méthodes d'essai, le produit chimique testé liquide est appliqué uniformément sur la surface de tissu (soit une application d'au moins 60 µL/cm<sup>2</sup>) (voir annexe II, 44)(45)(46)(47)). Il convient d'éviter autant que possible les effets de capillarité (effets de tension de surface) pouvant être observés en raison des faibles volumes appliqués sur les inserts (surface de tissu), ce afin de garantir un bon dosage sur le tissu. Les tissus traités avec les produits chimiques testés liquides sont incubés pendant 1 minute (TIO LabCyte CORNEA-MODEL24) ou 30 minutes (MRV1 et MRV2) dans les conditions de culture normalisées de chaque méthode. À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques testés et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> à température ambiante. Dans les deux MRV, cette étape de rinçage doit être suivie par une immersion post-traitement dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique testé absorbé par le tissu) pendant une durée prédéfinie qui varie en fonction de la MRV utilisée. Le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™, une incubation post-traitement est réalisée dans un milieu de culture frais dans les conditions de culture normalisées avant d'effectuer le test CT (voir annexe II, (44)(45)(46)(47)).

35. Les produits chimiques testés ne pouvant pas être appliqués à la pipette à 37°C ou à des températures plus basses sont considérés comme des solides dans les quatre méthodes d'essai. La quantité appliquée doit être suffisante pour recouvrir complètement la surface de tissu, à savoir une application d'au moins 33 mg/cm<sup>2</sup> (annexe II). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Les tissus traités avec les produits chimiques testés solides sont incubés pendant une durée prédéfinie (suivant la méthode utilisée) dans les conditions de culture normalisées (voir annexe II, (44)(45)(46)(47)). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques testés et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> à température ambiante. Dans les deux MRV, cette étape de rinçage doit être suivie par une immersion post-traitement dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique testé absorbé par le tissu) pendant une durée prédéfinie qui varie en fonction de la MRV utilisée, puis par une incubation post-traitement dans un milieu de culture frais dans les conditions de culture normalisées, avant d'effectuer le test CT (voir annexe II, (44)(45)(46)(47)).

36. 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 testés (%viabilité<sub>test</sub>). La substance recommandée pour le témoin positif dans les MRV et TIO MCTT HCE™ est l'acétate de méthyle pur (N° CAS 79-20-9 ; Sigma-Aldrich, Cat# 45997 ; liquide), pour le protocole des liquides et pour le protocole des solides. Les substances recommandées pour le témoin positif dans le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 sont l'éthanol (N° CAS 64-17-5) pour le protocole des liquides et l'acide laurique (N° CAS 143-07-7) pour le protocole des solides. Les substances recommandées pour le témoin négatif dans la MRV1 est l'eau (H<sub>2</sub>O) extra-pure pour les protocoles liquides et solides. Les substances recommandées pour le témoin négatif pour être utilisé avec le VRM2 et le TIO MCTT HCE™ est le DPBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> pour le protocole des liquides et le protocole des solides. La substance recommandée pour le témoin négatif dans le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 est le DPBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (N° CAS 64-17-5) pour le protocole des liquides et aucun traitement pour le protocole des solides. Ces substances sont celles employées comme témoins dans les études de pré-validation et de validation des MRV, et celles pour lesquelles il existe le plus de données historiques. L'utilisation d'autres substances adéquates pour les témoins positifs et négatifs doit être dûment

justifiée scientifiquement. Les témoins négatif et positif sont testés suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour les produits chimiques testés dans l'épreuve (liquides et solides). Cette application est suivie d'une exposition au traitement, d'un rinçage, d'une immersion post-traitement et d'une incubation post-traitement le cas échéant, tel que décrit pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques liquides (voir paragraphe 34) ou pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques solides (voir paragraphe 35), avant d'effectuer le test CT (voir paragraphe (37)(44)(45)(46)(47)). Un seul témoin positif et un seul témoin négatif par épreuve suffisent pour tous les produits chimiques testés présentant le même état physique (liquide ou solide).

### **Mesure de la viabilité tissulaire**

37. Le test CT est une méthode quantitative normalisée (20)(21)(22) utilisée pour quantifier la viabilité des tissus dans la présente Ligne directrice. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. Le test ST est réalisé immédiatement après les procédures post-traitement. Les MRV utilisent le test MTT. Selon les MRV, l'échantillon de modèle 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 modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un volume adéquat d'isopropanol (ou d'un solvant similaire)(44)(45). Pour les tissus exposés à des produits chimiques testés liquides, l'extraction est faite à partir des couches supérieure et inférieure des tissus, tandis que, pour les tissus exposés à des produits chimiques testés 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 testé présent dans les tissus). Pour les tissus exposés à des produits chimiques testés difficiles à rincer, l'extraction peut aussi être faite à partir de la seule couche inférieure du tissu. Le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 utilise le test WST-8. Selon le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24, l'échantillon de modèle d'EChR est immergé dans 0.3 mL de solution WST-8 diluée, préparée selon les modes opératoires normalisés (46), pendant 240 minutes dans les conditions de culture normalisées, et le colorant vital WST-8 est réduit en un formazan WST-8 jaune dans les cellules viables du modèle d'EChR, qui est dissous dans la solution WST-8 diluée (46). Le TIO MCTT HCE™ utilise le test WST-1. Dans le TIO MCTT HCE™, l'échantillon de construction tissulaire RhCE est placé dans 0,3 mL de solution WST-1 diluée, préparée selon les procédures opératoires normalisées (47), pendant 180 minutes dans des conditions de culture standard et le colorant vital WST-1 est réduit en un WST-1 jaune formazan par les cellules viables de la construction tissulaire RhCE, qui est dissous dans la solution diluée WST-1 (47). Les substances témoin positives et négatives testées en parallèle sont traitées de la même manière que les produits chimiques testés. Dans la MRV1 et la MRV2, le formazan MTT 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 44)(10)(48)). Dans le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™, le formazan WST-8/-1 peut être quantifié directement (c'est-à-dire sans qu'une procédure d'extraction soit nécessaire), soit par mesure de l'absorbance (DO) à 450 nm et avec un filtre passe-bande d'une largeur maximale de ±30 nm, soit par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir paragraphe 43) .

38. Les propriétés optiques du produit chimique testé ou son action chimique sur le CT (MTT pour la MRV1 et la MRV2, ou WST-8 pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou le WST-1 pour le TIO MCTT HCE™) sont susceptibles d'interférer avec le test CF et de conduire à des estimations erronées de la viabilité des tissus c'est-à-dire une sous prédiction de l'irritation oculaire. Les produits chimiques testés sont susceptibles d'interférer avec le test CF par réduction directe du CT en CF coloré (formazan MTT bleu ou formazan WST-8/-1 jaune) et/ou par interférence de couleurs si le produit chimique testé absorbe,

naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de DO que le CF (soit environ 570 nm dans le cas du formazan FTT et environ 450 nm dans le cas du formazan WST-8/-1). Le potentiel des produits chimiques de réduire directement le CT et/ou d'interférer avec la mesure de la couleur (uniquement nécessaire pour les produits chimiques colorés) doit être vérifié avant l'essai (pour VRM1, VRM2 et LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, MCTT HCE™ EIT). En cas d'interférence avec le CF, des vérifications préliminaires sont effectuées avant le test, pour permettre de repérer les éventuels produits chimiques réducteurs directs du CT et/ou provoquant une interférence de couleurs, et des témoins supplémentaires sont préparés pour corriger les interférences pouvant être causées par ces produits chimiques (voir paragraphes 39-43 et Annexes 3-6). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique testé 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 d'EChR au moment où le test CT est mené. Pour les produits chimiques testés qui absorbent la lumière dans la même plage que le CF (naturellement ou après traitement), et qui sont incompatibles avec la mesure de l'absorbance (DO) du CF à cause d'une interférence excessive – absorption élevée à  $570\pm 30$  nm dans le cas du formazan MTT ou de  $450\pm 30$  nm dans le cas du formazan WST-8/-1–, une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie peut être effectuée pour mesurer la présence de CF (voir paragraphes 43) (10)(48). On trouvera dans le mode opératoire normalisé de chaque méthode une description détaillée de la manière de détecter la réduction directe du CT et les interférences dues aux agents colorants et de corriger l'essai en conséquence (44)(45)(46)(47). En outre, des logigrammes présentant les étapes pour identifier et gérer les produits chimiques réducteurs directs du CT et/ou qui provoquent une interférence de couleurs dans les MRV1 et MRV2 et dans le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 et le TIO MCTT HCE™ figurent respectivement dans les annexes III, IV V et VI

39. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques testés absorbant la lumière dans la même plage que le CF (naturellement ou après traitement), et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, le produit chimique testé est mélangé à de l'eau et/ou de l'isopropanol et incubé pendant une durée appropriée à température ambiante (voir annexe II, (44)(45)(46)(47)). Si le produit chimique testé dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de  $570\pm 20$  nm pour la MRV1 (voir annexe III), ou si l'on obtient une solution colorée en mélangeant le produit chimique testé avec de l'eau pour la MRV2 (voir annexe IV) le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 (voir annexe V et le TIO MCTT HCE™ (voir annexe VI) alors on considère que le produit chimique testé interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du CF et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 43 et 44 et annexes III, IV, V et VI (44)(45)(46)(47)). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique testé causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution de CT lors de l'étape de l'incubation avec le CT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants (CNSvivants) (39)(40)(41). Le témoin CNSvivants est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique testé coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin CNSvivants indépendant est effectué 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 ou WST-8/-1 (%viabilitétest) 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 ou WST-8/-1 en parallèle de l'essai à corriger (%CNSvivants), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilitétest] – [%CNSvivants].

40. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT ou du WST-8/-1, il convient d'ajouter chaque produit chimique testé à un milieu CT fraîchement préparé. Une quantité adéquate de produit chimique testé est ajoutée à une solution CT et le mélange est incubé pendant environ 3 ou 4 heures dans les conditions de culture normalisées (voir annexes III, IV, V et VI) (44)(45)(46)(47). Si le mélange de CT et de produit chimique testé (ou la suspension testée pour les produits chimiques testés insolubles) devient bleu/violet (solution MTT) ou jaune/orange (solution WST-8/-1), on considère que le produit chimique testé est un réducteur direct du CT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles de tissus d'EChR non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) 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 testé dans des proportions similaires aux tissus viables. Dans la MRV1 et le TIO MCTT HCE™, les tissus tués sont préparés par exposition à des températures basses (« tués par congélation »). Dans la MRV2, les tissus tués sont préparés par une incubation longue (au moins 24±1h, par exemple) dans l'eau suivie d'un stockage à basse température (« tués dans l'eau »). Dans le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24, les tissus tués sont préparés par congélation à une température égale ou inférieure à -80 °C pendant 30 minutes à deux reprises (« tués par congélation »). Chaque produit chimique réducteur du CT 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 CT (NSMTT ou NSWST) (44)(45)(46)(47). Un seul témoin NSMTT ou NSWST par produit chimique testé suffit, indépendamment du 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 CT (%viabilitétest) moins le pourcentage de réduction non spécifique du CT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%NSMTT ou %NSWST), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilitétest] - [%NSMTT ou %NSWST].

41. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une interférence de couleurs (voir paragraphe 39) et une réduction directe du CT (voir paragraphe 40), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins NSMTT ou NSWST et CNSvivants décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques testés foncés qui absorbent la lumière à une longueur d'onde de 570±30 nm avec le formazan MTT (bleus, violets, noirs, par exemple) ou pour les produits chimiques testés clairs qui absorbent la lumière à une longueur d'onde de 450±30 nm avec le formazan WST-8/-1 (jaune, orange, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT ou du WST-8/-1 décrite au paragraphe 40. Cela rend la réalisation des témoins NSMTT ou NSWST et CNSvivants obligatoire par principe. Les produits chimiques testés nécessitant la réalisation des deux témoins NSMTT et CNSvivants sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin NSMTT ou NSWST peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du CT du produit chimique testé, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique testé par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné que le témoin CNSvivants permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique testé par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (CNStués) doit être préparé (voir annexes III et IV)(44)(45)(46)(47) Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique testé 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 CT lors de l'étape d'incubation avec CT. Un seul témoin CNStués par produit chimique testé suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT ou NSWST 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 testé (%viabilitétest) moins %NSMTT ou %NSWST moins %CNSvivants plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique testé causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%CNStués), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilitétest] - [%NSMTT ou %NSWST] - [%CNSvivants] + [%CNStués].

42. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du CT et 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 CT peut aussi élargir la surface de pic de CF de l'échantillon au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par CLHP/CLUP-spectrophotométrie). Lors de l'utilisation d'EChR, il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic) à l'aide de formazan MTT (N° CAS 57360-69-7) disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Sigma-Aldrich (Cat # M2003), ou de formazan WST-8 (N° CAS 193149-76-7), disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Dojindo Molecular Technologies ou formazan WST-1 (N°CAS 150849-53-9) disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Toronto Research Chemicals (Cat #I718750)

43. La mesure de l'absorbance (DO) avec un spectrophotomètre est indiquée pour l'évaluation des produits chimiques testés réducteurs directs du CT et causant une interférence de couleurs, lorsque l'interférence observée n'est pas trop forte par rapport à la mesure du CF (c'est-à-dire lorsque les DO des échantillons obtenus pour le produit chimique testé sans correction pour tenir compte de la réduction directe du CT et/ou de l'interférence de couleurs sont comprises dans la plage de linéarité du spectrophotomètre). Cependant, les résultats correspondant aux produits chimiques testés pour lesquels les valeurs %NSMTT ou %NSWST et/ou %CNSvivants sont  $\geq 60\%$  (MRV1, et MRV2 pour le protocole des liquides et MCTT HCE™ pour le protocole des solides) ou  $50\%$  (MRV2 pour le protocole des solides) ou  $40\%$  (TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou  $35\%$  (MCTT HCE™ pour les liquides du témoin négatif doivent être utilisés avec précaution, car il s'agit des seuils retenus dans les MRV pour faire la distinction entre les produits chimiques relevant d'une catégorie et ceux « sans catégorie » (voir paragraphe 46). A contrario, l'absorbance (DO) ne peut pas être mesurée lorsque l'interférence avec la mesure du CF 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 testés colorés ou ceux devenant colorés au contact de l'eau ou de l'isopropanol qui interfèrent fortement avec l'absorbance (DO) mesurée pour le CF peuvent être évalués par une procédure de CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir annexes III, IV, V et VI), car le système CLHP/CLUP permet de séparer le CF du produit chimique avant la quantification (48). Pour cette raison, les témoins CNSvivants et CNStués ne sont pas nécessaires pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique soumis à l'essai. Les témoins NSMTT ou NSWST sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique testé soit un réducteur direct du CT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 40). Les témoins NSMTT ou NSWST sont aussi nécessaires pour les produits chimiques testés colorés (naturellement ou au contact de l'eau) dont la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du CT comme décrit au paragraphe 40. Lorsqu'une procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée pour quantifier le CF, la viabilité tissulaire est calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de CF obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique testé avec la surface de pic de CF obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques testés réducteurs directs du CT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : %viabilitétest moins %NSMTT ou %NSWST, comme décrit à la dernière phrase du paragraphe 39. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du CT ou les réducteurs directs du CT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du CT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des échantillons testés situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre,

ne peuvent pas être évalués avec les méthodes d'essai sur EChR ; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

44. La procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le CF pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs du CT ou non) (10)(48). 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, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le CT à partir d'échantillons en remplissant les critères d'acceptabilité pour 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 (48)(49). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'annexe VII. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'annexe VII 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 CF dans les conditions expérimentales décrites dans la présente Ligne directrice d'essai.

### ***Critères d'acceptation***

45. Pour chaque épreuve recourant à des lots de tissus d'EChR remplissant les critères du contrôle de qualité (voir paragraphe 32), les tissus traités avec le témoin négatif présentent une DO reflétant la qualité des tissus qui ont été transportés, réceptionnés et soumis à toutes les étapes du protocole et se situant dans les limites historiques décrites au tableau 2 (voir paragraphe 28). De même, les tissus traités avec le témoin positif, c'est-à-dire l'acétate de méthyle (pour la MRV1 et la MRV2 et le TIO MCTT HCE™), l'éthanol (pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 avec le protocole des liquides) ou l'acide laurique (pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 avec le protocole des solides), présentent, par comparaison avec le témoin négatif, une viabilité cellulaire < 50 % pour la MRV1 (protocole des liquides ou protocole des solides), une viabilité cellulaire ≤ 30 % (protocole des liquides) ou ≤ 20 % (protocole des solides) pour la MRV2, ≤35% relatif au contrôle négatif dans le TIO MCTT HCE™ et une viabilité cellulaire ≤ 40 % pour le TIO LabCyte CORNEA-MODEL24. Ces valeurs reflètent la capacité des tissus à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (39)(40)(41). La variabilité entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques testés 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 entre 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 testé se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'essai est considéré comme « non valable » est le produit chimique doit être à nouveau soumis à l'essai.

### ***Interprétation des résultats et modèle prédictif***

46. Les valeurs de DO/surfaces de pic obtenues avec les réplicats d'échantillons pour chaque produit chimique testé sont utilisées pour calculer le pourcentage moyen de viabilité tissulaire (moyenne entre les réplicats de tissus) par rapport à la viabilité du témoin négatif (fixée à 100 %). La valeur seuil du pourcentage de viabilité tissulaire, qui permet de distinguer les produits chimiques relevant d'une catégorie pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves de ceux « sans catégorie » selon le SGH de l'ONU, est donnée au tableau 4. Les résultats sont donc interprétés comme suit :

- Le produit chimique testé 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-traitement est supérieur (>) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire,

conformément au tableau 4. Dans ce cas, aucun essai supplémentaire avec d'autres méthodes d'essai n'est nécessaire.

- Aucune prédiction n'est possible à partir de ce résultat pris isolément si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-traitement est inférieur ou égal ( $\leq$ ) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire, conformément au tableau 4., C'est pour cela qu'en cas de vrai positif, les méthodes ne permettent pas de distinguer entre les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU (voir paragraphe 19). De plus l'essai EChR montre un fort pourcentage de faux positifs (voir paragraphe 14-17. Dans les cas de figure, nécessite des informations supplémentaires à toute fin de classification (se référer au document guide (3) pour plus d'information).

**Tableau 4. Modèles de prédiction d'après la classification du SGH de l'ONU**

Méthode d'essai	Sans catégorie	Aucune prédiction possible
<b>TIO EpiOcular™ (pour les deux protocoles)</b>	Viabilité tissulaire moyenne > 60 %	<b>Viabilité tissulaire moyenne <math>\leq</math> 60 %</b>
<b>TIO HCE SkinEthic™ (pour le protocole des liquides)</b>	Viabilité tissulaire moyenne > 60 %	<b>Viabilité tissulaire moyenne <math>\leq</math> 60 %</b>
<b>TIO HCE SkinEthic™ (pour le protocole des solides)</b>	Viabilité tissulaire moyenne > 50 %	<b>Viabilité tissulaire moyenne <math>\leq</math> 50 %</b>
<b>TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 (pour les deux protocoles)</b>	Viabilité tissulaire moyenne > 40 %	<b>Viabilité tissulaire moyenne <math>\leq</math> 40 %</b>
<b>TIO MCTT HCE™ (Pour le protocole des liquides)</b>	Variabilité tissulaire moyenne > 35%	Variabilité tissulaire moyenne $\leq$ 35%
<b>TIO MCTT HCE™ (Pour le protocole des solides)</b>	Variabilité tissulaire moyenne > 60%	Variabilité tissulaire moyenne $\leq$ 60%

47. Un seul essai réalisé à l'aide d'au moins deux répliqués de tissus devrait suffire pour tester un produit chimique dont 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 égal à  $60 \pm 5$  % (MRV1, et MRV2 pour le protocole des liquides et le TIO MCTT HCE™ pour le protocole des solides),  $50 \pm 5$  % (MRV2 pour le protocole des solides) ou  $40 \pm 5$  % (TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 ou  $35 \pm 5$  % (le TIO MCTT HCE™ pour le protocole des liquides, une seconde répétition est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

48. Les produits chimiques étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel de lésions oculaires graves/d'irritation oculaire de produits chimiques ou de mélanges inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel relatif de toxicité oculaire d'un produit chimique classé dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### *Données*

49. Les données de chaque réplicat de tissus dans une épreuve (valeurs DO/surfaces de pic de CF, données calculées du pourcentage de viabilité tissulaire pour le produit chimique testé et pour le témoin, prédiction conclusive de la méthode d'essai sur EChR, par exemple) sont présentées dans un tableau pour chacun des produits chimiques testés, y compris les données des répétitions, le cas échéant. De plus, 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 testés et pour les témoins sont présentés. Toute interférence avec le test CF observée pour un produit chimique testé à cause de la réduction directe du CT et/ou d'une interférence de couleurs est indiquée pour chacun des produits chimiques soumis à essai.

### *Rapport d'essai*

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

Produit chimique testé

- 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 ;
  - État physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles ;
  - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.
  - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
  - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélange
  - Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;
  - État physique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles ;
  - Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.
  - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
  - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

### *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, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles ;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, 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 protocole employés (explication des raisons du choix, le cas échéant)*

#### *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 CF, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre) ;
- Description de la méthode de quantification du CF employée ;
- Description du système CLHP/CLUP-spectrophotomètre utilisé, le cas échéant ;
- Informations complètes sur le modèle spécifique d'EChR utilisé, notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative) :
  - i) Viabilité lors du contrôle qualité (fournisseur) ;
  - ii) Viabilité dans les conditions de la méthode d'essai (utilisateur) ;
  - iii) Fonction de barrière lors du contrôle qualité ;
  - iv) Morphologie, selon les informations disponibles ;
  - v) Autre contrôle de qualité (CQ) des modèles tissulaires d'EChR, selon les informations disponibles ;
- Références 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 pour les épreuves et pour l'essai
- Moyennes et fourchettes de valeur acceptables pour les témoins positifs et négatifs, sur la base des données historiques ;
- Variabilité acceptable entre les répliqués de tissus pour les témoins positifs et négatifs ;
- Variabilité acceptable entre les répliqués de tissus pour les produits chimiques testés ;

#### *Mode opératoire*

- Détails du protocole utilisé ;

- Doses employées pour le produit chimique testé et les substances témoin ;
- 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 protocole ;
- Indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du ST et/ou pour les produits chimiques testés colorés, le cas échéant ;
- Nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique testé et substance témoin (témoin positif, témoin négatif, NSMTT ou NSWST, CNSvivants et CNStués, le cas échéant) ;

## *Résultats*

- Tableau de données pour chaque produit chimique testé et substance témoin pour chaque épreuve (et ses répétitions, le cas échéant) et pour les mesures de chaque réplicat, y compris la valeur de DO ou la surface de pic du CF, le pourcentage de viabilité tissulaire, le pourcentage moyen de viabilité tissulaire, la différence ou l'écart-type entre les réplicats de tissus, et la prédiction finale ;
- Le cas échéant, résultats des témoins réalisés pour les réducteurs directs du CT et/ou les produits chimiques colorés, y compris la valeur de DO ou la surface de pic de CF, %NSMTT ou %NSWST, %CNSvivants, %CNStués, différence ou écart-type entre les réplicats de tissus, pourcentage final corrigé de viabilité tissulaire, et prédiction finale ;
- Résultats obtenus pour le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) et les substances témoin comparés aux critères d'acceptation pour les épreuves et pour l'essai ;
- Description des autres effets observés, par exemple, coloration des tissus par un produit chimique testé coloré ;

## *Discussion des résultats*

## *Conclusion*

## BIBLIOGRAPHIE

1. UN. (2017). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.7, Seventh Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: [[http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev07/English/ST-SG-AC10-30-Rev7e.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/ST-SG-AC10-30-Rev7e.pdf)].
2. OECD. (2012). 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>].
3. OECD (2017). 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.
4. OECD. (2013). 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>].
5. OECD. (2013). 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>].
6. OECD. (2012). 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>].
7. OECD. (2015). 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>].
8. Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. ALTEX 27, Special Issue 2010, 261-266.
9. EC EURL ECVAM. (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>].
10. EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC opinion No. 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>].
11. Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. Toxicol. In Vitro 31, 43-53.

12. Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
13. EURL ECVAM Science Advisory Committee. (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No. 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi : 10.2787/390390. Available at: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>].
14. Me-too validation report-Validation study for LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST, February 2017, available at: <http://www.jacvam.jp/files/doc/0611/0611D1.pdf>
15. Lim, S.E., Ha, S.J., Jang, W.H., Jung, K.M., Jung, M.S., Yeo, K.W., Kim, J.S., Jeong, T.C., Kang, M.J., Lee, S.H., Ko, K.Y., Kim, T.S., Park, K.S., Bae, S. and Lim, K.M. Me-Too validation study for in vitro eye irritation test with 3D-reconstructed human cornea epithelium, MCTT HCE™. *Toxicol. In Vitro* 55, 173-184.
16. OECD (2018). Peer Review Report on Validation status of the LabCyte CORNEA-MODEL24 EYE IRRITATION TEST , OECD Series on Testing and Assessment No.282. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
17. Peer Review Report on Validation status of the MCTT HCE™ EYE IRRITATION TEST, unpublished.
18. 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.
19. 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.
20. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
21. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M., (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36, 47–50.
22. Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M., & He, P. G. (1993). A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 41(6), 1118-1122.
23. OECD. (2016). Series on Testing and Assessment No. 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
24. 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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

25. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
26. 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.
27. Katoh, M., Uemura, N., Hamajima, F., Ogasawara T., Hata, K. (2012). Morphological characterization of a reconstructed human corneal epithelial model (LabCyte CORNEA-MODEL) as an alternative to the draize eye test for the assessment of eye irritation. *AATEX*. 17, 22-28.
28. Jung, K. M., Lee, S. H., Ryu, Y. H., Jang, W. H., Jung, H. S., Han, J. H., Seok, S. H., Park, J. H., Son, Y., Park, Y. H. and Lim, K. M. (2011). A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. *Toxicol In Vitro* 25, 403-410.
29. Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
30. Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
31. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara T., Hata, K.. (2013). Establishment of a new in vitro test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL. *Toxicol. In Vitro*. 27, 2184-2192.
32. Yang, H., Kim, D. E., Jang, W. H., An, S., Cho, S. A., Jung, M. S., Lee, J. E., Yeo, K. W., Koh, S. B., Jeong, T. C., Kang, M. J., Chun, Y. J., Lee, S. H., Lim, K. M. and Bae, S. (2017). Prevalidation trial for a novel in vitro eye irritation test using the reconstructed human cornea-like epithelial model, MCTT HCE. *Toxicol. In Vitro* 39, 58-67.
33. Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for In Vitro Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
34. 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.
35. 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.
36. 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.

37. Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
38. 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.
39. J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.
44. 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.
45. EpiOcular™ EIT SOP, Version 8. (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [<http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
46. SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [<http://www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
47. TIO LabCyte CORNEA-MODEL24 SOP, Version 2.5.6. (February, 2017). LabCyte CORNEA-MODEL24 eye irritation test operation protocol. Available at: [[http://www.jacvam.jp/files/doc/06\\_11/06\\_11\\_E1.pdf](http://www.jacvam.jp/files/doc/06_11/06_11_E1.pdf)].
48. MCTT HCE™ EIT SOP, Version 1.7. (August, 2018). MCTT HCE™ eye irritation test operation protocol. Available at: <http://www.keraskin.co.kr/eng/product/mucosamodel.asp>].
49. 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.
50. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

## ANNEX I - DÉFINITIONS

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

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

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

**Catégorie 2 du SGH** : voir « irritation oculaire ».

**CF (colorant formazan)** : produit chromogène de la réduction du MTT, WST-8 ou WST-1.

**Cl<sub>50</sub>** : concentration nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application d'un produit chimique étalon pendant un temps d'exposition fixe (traitement de 30 ou 60 minutes au SDS, par exemple).

**CLHP** : chromatographie en phase liquide à haute performance.

**CLUP** : chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance.

**CNS<sub>tués</sub>** : couleur non spécifique dans les tissus tués.

**CNS<sub>vivants</sub>** : couleur non spécifique dans les tissus vivants.

**Concordance** : voir « Précision ».

**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.

**CT (colorant tétrazolium)** : sels de tétrazolium MTT et WST-8 et WST-1

**CV** : coefficient de variation.

**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.

**Dose infinie** : quantité de produit chimique testé appliquée sur le modèle tissulaire d'EChR qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface épithéliale.

**EChR** : épithélium cornéen humain reconstitué.

**Effets irréversibles sur l'œil** : voir « lésions oculaires graves ».

**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 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 testés possibles (21).

**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.

**ET** : écart-type.

**EURL ECVAM** : laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la validation de méthodes alternatives.

**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 (21).

**HCE** : épithélium cornéen humain du SkinEthic™.

**Irritation oculaire** : modification de l'œil qui est totalement réversible survenant après l'exposition de l'œil à une substance ou un mélange. 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, et qui n'est pas totalement réversible survenant après l'exposition de l'œil à une substance ou un mélange. 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 composée de deux substances ou plus, 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 (24).

**Méthode d'essai validée** : méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) 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 de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (21).

**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.

**MRV1** : le TIO EpiOcular™ est désigné Méthode de référence validée 1.

**MRV2** : le TIO HCE SkinEthic™ est désigné Méthode de référence validée 2.

**MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; bleu de thiazolyl ; bromure de tétrazolium (N° CAS 298-93-1)

**Non classé selon le SGH de l'ONU** : produit chimique ne relevant d'aucune classification selon le SGH pour catégorie 1 ou catégorie 2 (2A ou 2B). Ce terme est interchangeable avec « sans catégorie ».

**Normes de performance** : normes, fondées sur une méthode d'essai validée et considérée comme scientifiquement valide, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (21).

**NSMTT** : réduction non spécifique du MTT.

**NSWST** : réduction non spécifique du WST-8 ou WST-1.

**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 (22).

**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 testé et d'étayer cette conclusion.

**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 des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment avec le terme « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (21).

**Produit chimique étalon** : produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique testé. Un produit chimique étalon doit posséder les propriétés suivantes : (i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables permettant de l'identifier et de le caractériser ; (ii) présenter une similitude structurale et/ou fonctionnelle avec la classe des produits chimiques testés ; (iii) posséder des caractéristiques physiques et chimiques connues ; (iv) être accompagné de données confirmant ses effets connus ; et (v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

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

**Produit chimique** : substance ou mélange.

**Reproductibilité** : accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir « fiabilité ») (24).

**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 ».

**Sensibilité** : proportion des produits chimiques positifs/actifs 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 (21).

**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).

**Spécificité** : proportion des produits chimiques testés 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 (24).

**Stratégie d'essai 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 danger potentiel ou l'ampleur du danger présenté par un produit chimique testé peut être déterminé sur la base des informations existantes à une étape donnée, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire (21).

**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** : 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).

**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.

**TE<sub>50</sub>** : temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application d'un produit chimique étalon à une concentration fixe spécifiée.

**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 testé 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. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance testée et les autres échantillons témoins. 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.

**TIO** : test d'irritation oculaire.

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

**WST** : sel de tétrazolium soluble dans l'eau

**WST-1** : sel de tétrazolium soluble dans l'eau - 1 [4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate; CAS RN 150849-52-8]

**WST-8**: sel de tétrazolium soluble dans l'eau-8 [2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium, sel monosodium] (N° CAS 193149-74-5).

ANNEXE II - PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DES MÉTHODES D'ESSAI SUR EChR VALIDÉES POUR L'IDENTIFICATION DE PRODUITS CHIMIQUES NE NÉCESSITANT AUCUNE CLASSIFICATION NI ÉTIQUETAGE POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSIONS OCULAIRES GRAVES

No.	1		2		3		4	
Éléments de la méthode d'essai	TIO EpiOcular™ – MRV1		TIO HCE SkinEthic™ – MRV2		TIO LabCyte CORNEA-MODEL24		TIO MCTT HCE™	
Protocole	Liquides	Solides	Liquides	Liquides (applicables à la pipette)	Liquides (applicables à la pipette)	Solides	Liquides (applicables à la pipette)	Liquides (non applicables à la pipette)
Surface du modèle	0.6 cm <sup>2</sup>	0.6 cm <sup>2</sup>	0.5 cm <sup>2</sup>	0.5 cm <sup>2</sup>	0.3 cm <sup>2</sup>	0.3 cm <sup>2</sup>	0.6 cm <sup>2</sup>	0.6 cm <sup>2</sup>
Nombre de répliqués de tissus	Au moins 2	Au moins 2	Au moins 2	Au moins 2	3 tissus	3 tissus	Au moins 2	Au moins 2
Pré- vérification des interférences de couleur	50 µL + 1 mL H <sub>2</sub> O pendant 60 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % (produits chimiques testés incolores), ou 50 µL + 2 mL isopropanol mélangés pendant 2-3 h à TA (produits chimiques testés colorés)  → si la DO du produit chimique testé à 570±20 nm,	50 mg + 1 mL H <sub>2</sub> O pendant 60 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % (produits chimiques testés incolores), et/ou 50 mg + 2 mL isopropanol mélangés pendant 2-3 h à TA (produits chimiques testés colorés et non colorés)  → si la DO du produit chimique	10 µL + 90 µL H <sub>2</sub> O mélangés pendant 30±2 min à température ambiante (TA, 18-28 °C)  → si le produit chimique testé est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés	10 mg + 90 µL H <sub>2</sub> O mélangés pendant 30±2 min à TA  → si le produit chimique testé est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés	50 µL + 0.5 mL d'eau distillée mélangés pendant 15 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %.  → si le produit chimique testé est coloré, il	10 mg + 0.5 mL d'eau distillée mélangés pendant 15 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %.  → si le produit chimique testé est	40 µL + 1 mL d'eau distillée mélangés pendant 60 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %.  → si la DO du produit chimique testé à 450±20 nm, après soustraction de la DO de l'H <sub>2</sub> O, est > 0.1 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du	40 mg + 1 mL d'eau distillée mélangés pendant 60 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %.  → si la DO du produit chimique testé à 450±20 nm, après soustraction de la DO de l'H <sub>2</sub> O, est > 0.1 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du

No.	1		2		3		4	
	après soustraction de la DO de l'isopropanol ou de l'H <sub>2</sub> O, est > 0.08 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	testé à 570±20 nm, après soustraction de la DO de l'isopropanol ou de l'H <sub>2</sub> O, est > 0.08 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.			convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.
<b>Pré- vérification de la réduction directe du MTT</b>	50 µL + 1 mL solution de MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation (50 µL d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	50 mg + 1 mL solution de MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation (50 µL d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30 µL + 300 µL solution de MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 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 µL d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30 mg + 300 µL solution de MTT à 1 mg/mL pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 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 µL d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	50 µL + 300 µL de milieu de WST-8 dilué pendant 240±20 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient jaune, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation.	10 mg + 300 µL de milieu de WST-8 dilué pendant 240±20 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient jaune, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation.	40 µL + 1mL de milieu de WST-1 dilué pendant 180±10 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient jaune, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation.	40 mg + 1mL de milieu de WST-1 dilué pendant 180±10 minutes à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient jaune, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation.
<b>Pré- traitement</b>	20 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> pendant 30±2 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %, à l'abri de	20 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> pendant 30±2 min à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %, à l'abri de la lumière.	-	-	-	-	-	-

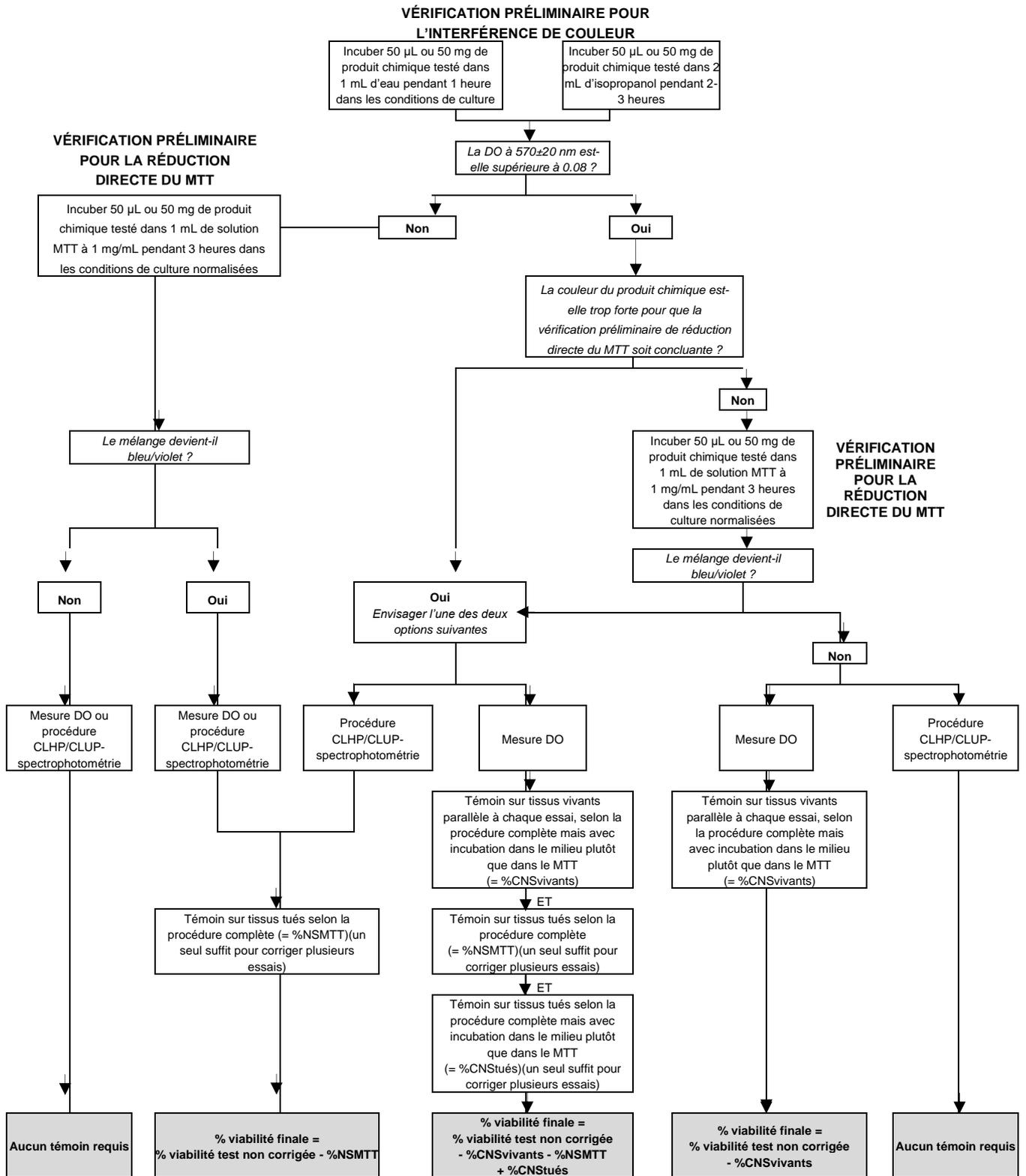
No.	1		2		3		4	
	la lumière.							
<b>Doses et application du traitement</b>	50 µL (83.3 µL/cm <sup>2</sup> )	50 mg (83.3 mg/cm <sup>2</sup> ) mesurés avec un outil calibré (une cuillère calibrée pour contenir 50 mg de chlorure de sodium, par exemple).	10 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30±2 µL (60 µL/cm <sup>2</sup> )  Pour les produits visqueux, utiliser du tulle de nylon	30 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 30±2 mg (60 mg/cm <sup>2</sup> )	50 µL (167 µL/cm <sup>2</sup> )	10 mg (33 mg/cm <sup>2</sup> )	40 µL (67 µL/cm <sup>2</sup> )	40 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + 40 ±1 mg (67 mg/cm <sup>2</sup> )
<b>Temps d'exposition et température</b>	30 min (±2 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	6 heures (±0.25 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	30 min (±2 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	4 heures (±0.1 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	1 minute (± 5 secondes) dans un milieu de culture à TA	24 heures (±1 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	10 min (±1 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥95% HR	3 hours (±5 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥95% HR
<b>Rinçage à température ambiante</b>	3 fois dans 100 mL de DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	3 fois dans 100 mL de DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	20 mL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	25 mL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	10 fois ou plus par jet de DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	10 fois ou plus par jet de DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	4 fois avec du PBS	4 fois avec 10 mL de DPBS et agiter dans 30 mL de DPBS dans le bécher
<b>Immersion post-traitement</b>	12 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	25 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	30 min (±2 min) à 37 °C, sous CO <sub>2</sub> 5 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	30 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	-	-	-	-

No	1		2		3		4	
Éléments de la méthode d'essai	TIO EpiOcular™ – MRV1		TIO HCE SkinEthic™ – MRV2		TIO LabCyte CORNEA-MODEL24		TIO MCTT HCE™	
Protocole	Liquides	Solides	Liquides	Solides	Liquides	Solides	Liquides	Solides
<b>Incubation post-traitement</b>	120 min (±15 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	18 h (±0.25 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	Aucune	18 h (±0.5 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	24 h (±1 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	Aucune	16 h (±1 h) en milieu de culture à 37±2°C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥95% HR	16 h (±1 h) en milieu de culture à 37±2°C, 5±1% CO <sub>2</sub> , ≥95% HR
<b>Témoin négatif</b>	50 µL H <sub>2</sub> O Testé en parallèle	50 µL H <sub>2</sub> O Testé en parallèle	30±2 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> Testé en parallèle	30±2 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> Testé en parallèle	50 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> Testé en parallèle	Aucun traitement Testé en parallèle	40 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> Testé en parallèle	40 µL DPBS sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> Testé en parallèle
<b>Témoin positif</b>	50 µL acétate de méthyle Testé en parallèle	50 µL acétate de méthyle Testé en parallèle	30±2 µL acétate de méthyle Testé en parallèle	30±2 µL acétate de méthyle Testé en parallèle	50 µL éthanol Testé en parallèle	10 mg acide laurique Testé en parallèle	40 µL acétate de méthyle ou 2% SDS Testé en parallèle	40 µL acétate de méthyle ou 2% SDS Testé en parallèle
<b>Solution de sel de tétrazolium</b>	300 µL à 1 mg/mL	300 µL à 1 mg/mL	300 µL à 1 mg/mL	300 µL à 1 mg/mL	300 µL de solution de WST-8 diluée (dilution de facteur 10 de CCK-8)	300 µL de solution de WST-8 diluée (dilution de facteur 10 de CCK-8)	300 µL de solution de WST-1 diluée (dilution de facteur 25 de WST-1)	300 µL de solution de WST-1 diluée (dilution de facteur 25 de WST-1)
<b>Incubation et température du sel de tétrazolium</b>	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	240 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	240 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±5 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±5 min) à 37±2°C, sous CO <sub>2</sub> 5±1 %, HR ≥ 95 %
<b>Solvant d'extraction</b>	2 mL isopropanol (extraction depuis le dessus et le	2 mL isopropanol (extraction depuis le dessous de	1.5 mL isopropanol (extraction depuis le dessus et le	1.5 mL isopropanol (extraction depuis le dessous de	Inutile	Inutile	Inutile	Inutile

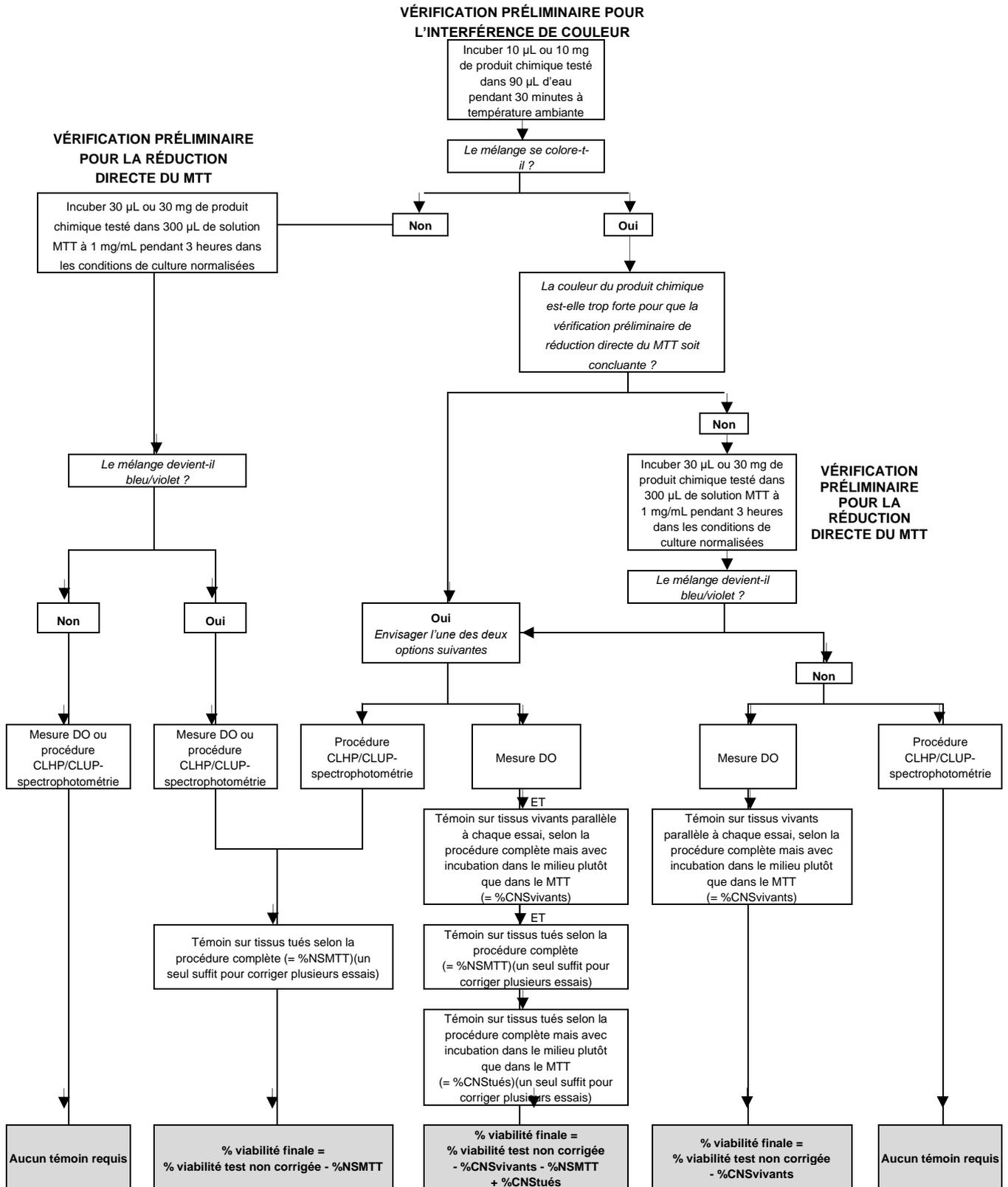
No	1		2		3		4	
	dessous de l'insert en perçant le tissu)	l'insert en perçant le tissu)	dessous de l'insert)	l'insert)				
<b>Durée et température d'extraction</b>	2-3 h en agitant (~120 tours/min.) à TA ou une nuit à 4-10 °C	2-3 h en agitant (~120 tours/min.) à TA ou une nuit à 4-10 °C	4 h en agitant (~120 tours/min.) à TA ou au moins une nuit sans agiter à 4-10 °C	Au moins 2 h en agitant (~120 tours/min.) à TA	Inutile	Inutile	Inutile	Inutile
<b>Lecture de la DO</b>	570 nm (550 - 590 nm) sans filtre de référence	570 nm (550 - 590 nm) sans filtre de référence	570 nm (540 - 600 nm) sans filtre de référence	570 nm (540 - 600 nm) sans filtre de référence	450 nm avec filtre de référence (650 nm)	450 nm avec filtre de référence (650 nm)	450 nm (420-480 nm) sans filtre de référence	450 nm (420-480 nm) sans filtre de référence
<b>Contrôle de qualité des tissus</b>	Traitement par 100 µL de Triton X-100 à 0.3 % (v/v) 12.2 min ≤ TE <sub>50</sub> ≤ 37.5 min	Traitement par 100 µL de Triton X-100 à 0.3 % (v/v) 12.2 min ≤ TE <sub>50</sub> ≤ 37.5 min	Traitement de 30 min par SDS (50 µL) 1.0 mg/mL ≤ CI <sub>50</sub> ≤ 3.5 mg/mL	Traitement de 30 min par SDS (50 µL) 1.0 mg/mL ≤ CI <sub>50</sub> ≤ 3.2 mg/mL	Traitement de 60 minutes par SDS (25 µL) 1.0 mg/mL ≤ CI <sub>50</sub> ≤ 4.0 mg/mL	Traitement de 60 minutes par SDS (25 µL) 1.0 mg/mL ≤ CI <sub>50</sub> ≤ 4.0 mg/mL	Traitement par 50 µL de Triton X-100 à 0.3 % (v/v) 17.6 min ≤ TE <sub>50</sub> ≤ 41 min	Traitement par 50 µL de Triton X-100 à 0.3 % (v/v) 17.6 min ≤ TE <sub>50</sub> ≤ 41 min
<b>Critères d'acceptation</b>	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 0.8 et < 2.8 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 30 minutes au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 0.8 et < 2.8 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 6 heures au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 1.0 et ≤ 2.5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 30 minutes au témoin positif, exprimée en % du témoin	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 1.0 et ≤ 2.5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 4 heures au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être ≥ 0.5 et ≤ 1.3 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin positif doit être ≤ 40 % 3. L'écart-type entre trois réplicats de tissus ne doit pas	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être ≥ 0.5 et ≤ 1.3 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin positif	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être ≥ 1.6 et ≤ 3.0 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin positif doit être ≤ 35 % 3. La différence de viabilité entre deux réplicats de tissus ne doit	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être ≥ 1.6 et ≤ 3.0 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin positif doit être ≤ 35 % 3. La différence de viabilité entre deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %

No	1		2		3		4	
	<p>être &lt; 50 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.</p>	<p>être &lt; 50 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.</p>	<p>négatif, doit être ≤ 30 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.</p>	<p>être ≤ 20 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.</p>	<p>dépasser 18 %</p>	<p>doit être ≤ 40 % 3. L'écart-type entre trois réplicats de tissus ne doit pas dépasser 18%</p>	<p>pas dépasser 20 %</p>	

**ANNEXE III - LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES TESTÉS RÉDUCTEURS DIRECTS DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE LA MRV1**



**ANNEXE IV** - LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES TESTÉS RÉDUCTEURS DIRECTS DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE LA MRV2



**ANNEXE V** - LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES TESTÉS RÉDUCTEURS DIRECTS DU WST ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DU TIO LABCYTE CORNEA-MODEL24

## VÉRIFICATION PRÉLIMINAIRE POUR L'INTERFÉRENCE DE COULEUR

Incuber 50 µL ou 10 mg de produit chimique testé dans 300 µL d'eau pendant 15 minutes à température ambiante

Le mélange se colore-t-il ?

Non

Oui

## VÉRIFICATION PRÉLIMINAIRE POUR LA RÉDUCTION DIRECTE DU WST

Incuber 50 µL ou 10 mg de produit chimique testé dans 300 µL de solution WST-8 pendant 4 heures dans les conditions de culture normalisées

Le mélange devient-il jaune ?

Non

Oui

La couleur du produit chimique est-elle trop forte pour que la vérification préliminaire de réduction directe du WST soit concluante ?

Non

Incuber 50 µL ou 10 mg de produit chimique testé dans 300 µL de solution WST-8 pendant 4 heures dans les conditions de culture normalisées

Le mélange devient-il jaune ?

## VÉRIFICATION PRÉLIMINAIRE POUR LA RÉDUCTION DIRECTE DU WST

Non

Oui  
Envisager l'une des deux options suivantes

Procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie

Mesure DO

Mesure DO

Procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie

Mesure DO ou procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie

Mesure DO ou procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie

Témoin sur tissus tués selon la procédure complète (= %NSWST)(un seul suffit pour corriger plusieurs essais)

Témoin sur tissus vivants parallèle à chaque essai, selon la procédure complète mais avec incubation dans le milieu plutôt que dans le WST-8 (= %CNSvivants)

Témoin sur tissus tués selon la procédure complète (= %NSWST)(un seul suffit pour corriger plusieurs essais)

Témoin sur tissus tués selon la procédure complète mais avec incubation dans le milieu plutôt que dans le WST-8 (= %CNStués)(un seul suffit pour corriger plusieurs essais)

Témoin sur tissus vivants parallèle à chaque essai, selon la procédure complète mais avec incubation dans le milieu plutôt que dans le WST-8 (= %CNSvivants)

Aucun témoin requis

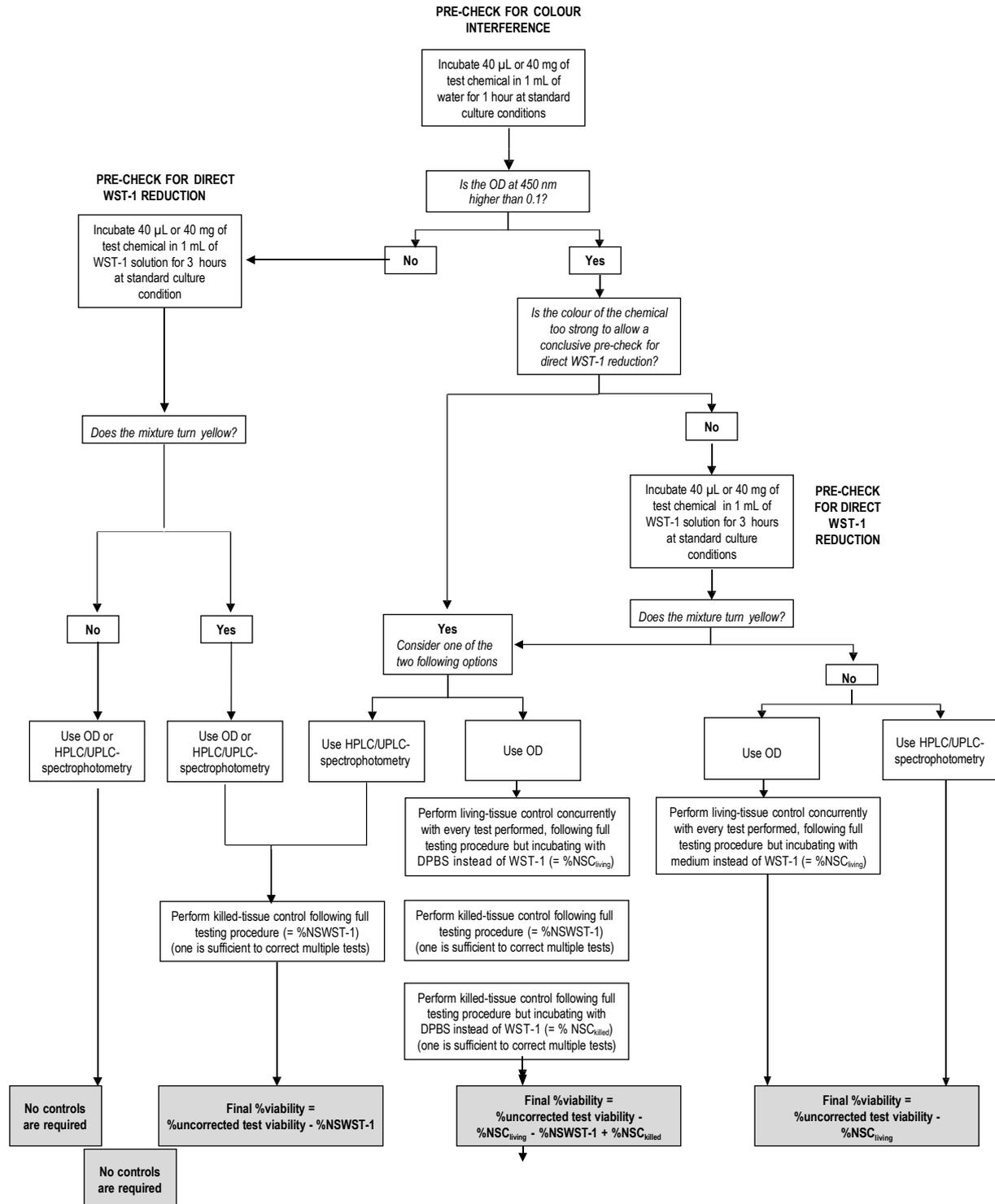
% viabilité finale = % viabilité test non corrigée - %NSWST

% viabilité finale = % viabilité non corrigée - %CNSvivants - %NSWST + %CNStués

% viabilité finale = % viabilité non corrigée - %CNSvivants

Aucun témoin requis

**ANNEXE VI - LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES TESTÉS RÉDUCTEURS DIRECTS DU WST ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DU TIO LABCYTE CORNEA-MODEL24 X**



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

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (43)(45)	Critères d'acceptation
<b>Sélectivité</b>	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)	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20 \% \text{ Surface}_{\text{VLIQ}}^1$
<b>Fidélité</b>	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)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$
<b>Précision</b>	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	$\% \text{ Écart} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$
<b>Effet de matrice</b>	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	$\% \text{ Effet de matrice} \geq 85 \% \text{ et } \leq 115 \%$
<b>Effet résiduel</b>	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ <sup>2</sup> normale	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20 \% \text{ Surface}_{\text{VLIQ}}$
<b>Reproductibilité (même jour)</b>	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 : $\% \text{ Écart} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$ Contrôles de qualité : $\% \text{ Écart}$
<b>Reproductibilité (d'un jour à l'autre)</b>	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)	$\leq 15 \% \text{ et } \text{CV} \leq 15 \%$
<b>Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR</b>	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	$\% \text{ Écart} \leq 15 \%$
<b>Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire</b>	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	$\% \text{ Écart} \leq 15 \%$

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

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