

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

Corrosion cutanée *in vitro* : Essai de résistance électrique transcutanée (RET)

INTRODUCTION

1. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent par une nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique testé [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU)] (1). Cette Ligne directrice 430 actualisée propose une procédure *in vitro* permettant d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1).

2. Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée a impliqué le recours à des animaux de laboratoire [Ligne directrice de l'OCDE n° 404 (LD 404) ; initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015] (2). Outre la présente LD 430, d'autres méthodes d'essai *in vitro* pour tester le potentiel de corrosion de la peau des produits chimiques ont été validées et adoptées ; elles constituent les Lignes directrices de l'OCDE 431 (3) et 435 (4), et sont capables d'identifier les sous-catégories de produits chimiques corrosifs quand cela est requis. Plusieurs méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées en tant que LD 439 (5), à utiliser pour tester l'irritation de la peau. Un Document Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation (IATA en anglais) pour l'irritation et la corrosion de la peau propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon 1) d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques testés, et 2) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (6).

3. La présente Ligne directrice porte sur le danger de corrosion cutanée pour la santé humaine. Elle s'appuie sur la méthode d'essai de résistance électrique transcutanée (RET) pratiquée sur un épiderme de rat, laquelle utilise des disques cutanés pour identifier les produits chimiques corrosifs sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière. La présente Ligne directrice a été initialement adoptée en 2004 et mise à jour en 2015 pour faire référence au Document Guide sur IATA.

4. En vue d'évaluer les essais de corrosion cutanée *in vitro* à des fins réglementaires, des études de pré-validation (7) ont été réalisées, suivies d'une étude formelle de validation de la méthode d'essai de RET sur peau de rat axée sur la corrosion cutanée (8) (9) (10) (11). Sur la base des résultats de ces études, il est désormais recommandé que la méthode d'essai de RET (désignée comme la méthode de référence

validée – MRV –) puisse servir, à des fins réglementaires, à évaluer la corrosivité cutanée *in vivo* (12) (13) (14).

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai *in vitro* de RET (corrosivité cutanée) similaire ou modifiée autre que la MRV, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, afin de s'assurer de sa similitude avec la MRV, conformément aux normes de performance (15). L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie qu'après examen et intégration à cette Ligne directrice de toute méthode d'essai nouvelle ou actualisée proposée, conformément aux normes de performance de cette LD.

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'annexe 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. Selon une étude de validation (10) et d'autres études publiées (16) (17), la méthode d'essai de RET sur peau de rat permet de faire la distinction entre produits corrosifs et produits non corrosifs pour la peau avec une sensibilité globale de 94 % (51/54) et une spécificité de 71 % (48/68) pour une base de données de 122 substances.

8. La présente Ligne directrice se rapporte au volet « corrosion cutanée *in vitro* ». Elle permet d'identifier les produits chimiques testés corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1). Une limite de cette Ligne directrice, comme l'ont montré les études de validation (8) (9) (10) (11), est qu'elle ne permet pas de classer en sous-catégories les substances et mélanges corrosifs conformément au SGH de l'ONU (1). Son utilisation sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres. Si la présente Ligne directrice ne fournit pas d'informations appropriées sur l'irritation cutanée, on notera cependant que la LD 439 porte spécifiquement sur les essais d'irritation cutanée *in vitro* (5). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, le Document Guide sur IATA (6) devra être consulté.

9. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette Ligne directrice ont porté sur un large éventail de produits chimiques représentant principalement des substances ; la base de données empiriques de cette étude totalisait 60 substances couvrant une grande variété de classes chimiques (8) (9). D'après l'ensemble des données disponibles, cette Ligne directrice peut être utilisée pour tester un large éventail de classes chimiques et d'états physiques, notamment des liquides, des semi-solides, des solides et des cires. Cependant, étant donné que pour certains états physiques, les éléments d'essai pour lesquels il existe des données de référence appropriées ne sont pas facilement disponibles, on notera qu'un nombre relativement restreint de cires et de matières solides corrosives ont été évaluées durant la validation. Les liquides peuvent être aqueux ou non ; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que les méthodes d'essai figurant dans cette Ligne directrice ne peuvent s'appliquer à une catégorie donnée de substances, il convient de ne pas utiliser cette Ligne directrice pour tester la catégorie de substances en question. De plus, outre les substances, cette Ligne directrice est présumée pouvoir s'appliquer aux mélanges. Or, les mélanges couvrant un large éventail de catégories et de compositions, et compte tenu des informations limitées disponibles actuellement à propos des essais de mélanges, dans les cas où l'on peut apporter la preuve que cette Ligne directrice ne peut s'appliquer à une catégorie donnée de mélanges (par exemple selon la stratégie proposée par Eskes *et al.*, 2012) (18), la LD ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de mélanges en question. Avant d'utiliser la présente Ligne directrice pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une

exigence réglementaire de tester le mélange. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (8) (9). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à la méthode d'essai de RET, l'actuelle Ligne directrice ne permet pas de tester les produits de ce type.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Le produit chimique testé est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau, placés dans un système d'essai à deux compartiments pour lequel les disques de peau font office de séparation entre les compartiments. Ces disques cutanés sont prélevés sur la peau de jeunes rats âgés de 28 à 30 jours et euthanasiés. Les produits chimiques corrosifs sont identifiés sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET en deçà d'une valeur seuil (16) (paragraphe 32). Dans le cas de l'épiderme de rat, une valeur de seuil de la RET de 5 k Ω a été retenue, sur la base de nombreuses données relatives à un large éventail de substances, desquelles il ressortait que l'immense majorité des valeurs étaient soit très supérieures (souvent > 10 k Ω), soit très inférieures (souvent < 3 k Ω) à cette valeur de seuil (16). De manière générale, les produits chimiques non corrosifs sur les animaux, mais irritants ou non irritants, ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Par ailleurs, l'utilisation d'autres préparations de peau ou d'autres équipements est susceptible de modifier la valeur de seuil, ce qui impose de procéder à une validation supplémentaire.

11. Une étape de fixation d'un colorant est incorporée dans la procédure d'essai pour confirmer les résultats positifs de la RET présentant des valeurs autour de 5 k Ω . Cette étape de fixation d'un colorant détermine en effet si l'accroissement de la perméabilité ionique est imputable à la destruction physique du *stratum corneum*. Dans la pratique, la méthode de l'essai de RET sur peau de rat prédit très bien la corrosivité *in vivo* sur le lapin évalué dans la Ligne directrice 404 de l'OCDE (2).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

12. Avant d'appliquer en routine la méthode de RET sur peau de rat à la présente Ligne directrice, les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze substances recommandés dans le tableau 1. Dans le cas où une substance ne serait pas disponible ou dans les cas où cela se justifie, une autre substance pour laquelle il existe des données de référence *in vivo* et *in vitro* peut être utilisée (par exemple en choisissant dans la liste des produits chimiques de référence (16)), pourvu que les mêmes critères de sélection tels que décrits dans le tableau 1 soient appliqués.

Tableau 1 : Liste des substances d'épreuve de compétence

Substance ¹	Numéro CAS	Classe chimique ²	Cat. SGH de l'ONU d'après les résultats <i>in vivo</i> ³	Cat. MRV d'après les résultats <i>in vitro</i>	État physique	pH ⁴
Substances corrosives <i>in vivo</i>						
N,N'-diméthyl dipropylènetriamine	10563-29-8	base organique	1A	6 x C	L	8.3
Diamino-1,2 propane	78-90-0	base organique	1A	6 x C	L	8.3
Acide sulfurique (10 %)	7664-93-9	acide inorganique	(1A)/1B/1C	5 x C 1x NC	L	1.2
Hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 10 %)	1310-58-3	base inorganique	(1A)/1B/1C	6 x C	L	13.2
Acide octanoïque (caprylique)	124-07-2	acide organique	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3.6
2-tert-butylphénol	88-18-6	phénol	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3.9
Substances non corrosives <i>in vivo</i>						
Acide isostéarique	2724-58-5	acide organique	NC	6 x NC	L	3.6
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	6 x NC	S	5.5
Bromure de phénylène	103-63-9	électrophile	NC	6 x NC	L	3.6
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	6 x NC	L	6.8
1,9-décadiène	1647-16-1	organique neutre	NC	6 x NC	L	3.9
tétrachloréthylène	127-18-4	organique neutre	NC	6 x NC	L	4.5

Abréviations : aq = aqueux ; CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service ; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (1) ; MRV = méthode de référence validée ; ND = non déterminé.

¹Ces substances d'épreuve de compétence, d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, puis par classe chimique, ont été choisies parmi les substances utilisées dans l'étude de validation du CEVMA de la méthode d'essai de RET sur peau de rat (8) (9). Sauf cas contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté obtenu pour les substances en provenance du commerce (9). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui : (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives ; faiblement à fortement corrosives) que la MRV est capable de mesurer ou de prévoir ; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation ; (iii) reflètent les caractéristiques de performance de la MRV ; (iv) ont une structure chimique bien définie ; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence ; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs.

²Classe chimique assignée par Barratt *et al.* (8).

³Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les catégories SGH de l'ONU 1A, 1B et 1C.

⁴Les valeurs de pH ont été tirées de Fentem *et al.* (9) et Barratt *et al.* (8).

PROCÉDURE

13. Il existe des modes opératoires normalisés pour la méthode d'essai de RET sur peau de rat (corrosion cutanée) (19). Les méthodes d'essai de RET sur épiderme de rat couvertes par cette Ligne directrice doivent se conformer aux critères suivants :

Animaux

14. Il convient d'utiliser des rats parce que la sensibilité de leur épiderme aux substances de cette méthode d'essai a été prouvée (12) et qu'il s'agit de la seule source de peau ayant été validée formellement (8) (9). L'âge (au moment du prélèvement de la peau) et la souche utilisée sont des critères déterminants, puisqu'il est essentiel que les follicules pileux soient en phase dormante avant le début de la pousse de la fourrure adulte.

15. Les poils du dos et des flancs des jeunes rats (Wistar ou souche comparable) mâles ou femelles, âgés approximativement de 22 jours, sont soigneusement coupés à l'aide d'une petite tondeuse. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tonduée étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième ou le quatrième jour après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours, lorsque le *stratum corneum* a récupéré de la tonte.

Préparation des disques cutanés

16. Les animaux, âgés de 28 à 30 jours (cet âge est particulièrement important) sont euthanasiés. On prélève la peau dorso-latérale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. Des disques cutanés, d'un diamètre approximatif de 20 mm chacun sont prélevés. La peau peut être stockée avant d'utiliser les disques lorsqu'il est établi que les données de contrôle positif et négatif sont équivalentes à celles obtenues avec de la peau fraîche.

17. Chaque disque cutané est placé sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir ajusté de force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé de manière étanche à l'extrémité du tube PTFE à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (figure 1). Le disque cutané doit être complètement immergé dans la solution de sulfate de magnésium (MgSO₄). Entre 10 et 15 disques cutanés peuvent être prélevés de la peau d'un rat. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la figure 2.

18. Avant le début de l'essai proprement dit, on mesure, pour chaque peau de rat, la RET de deux disques cutanés, à titre de contrôle de la qualité. Pour que les autres disques d'une même peau soient valables pour la méthode d'essai, il faut que les deux disques donnent des valeurs de résistance électrique supérieures à 10 kΩ. Si la résistance est inférieure à 10 kΩ, les disques restants provenant de la même peau doivent être éliminés.

Application du produit chimique testé et substances de contrôle

19. Pour chaque essai, des substances de contrôle positif et négatif doivent être utilisées parallèlement au produit chimique testé, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Chaque essai doit être réalisé en utilisant les disques de peau provenant d'un seul et même animal. Les substances de contrôle positif et négatif recommandées sont respectivement l'acide chlorhydrique 10 M et l'eau distillée.

20. Les produits chimiques liquides testés (150 µl) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube. Pour l'essai de produits chimiques solides, une quantité suffisante du solide est appliquée uniformément sur le disque de peau, de façon à ce que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 µl) sur les solides, on agite le tube doucement. Afin d'optimiser le contact avec la peau, certains solides doivent être chauffés à 30 °C pour dissoudre le produit chimique testé ou être broyés pour obtenir des grains ou une poudre.

21. On utilise trois disques cutanés pour chaque produit chimique testé à chaque expérience. Ces produits chimiques testés sont appliqués pendant 24 heures à une température de 20 à 23 °C, puis éliminés par lavage sous l'eau du robinet à température ambiante.

Mesures de la RET

22. L'impédance de la peau, c'est-à-dire la RET, est mesurée à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone en courant alternatif basse tension (18), présentant les caractéristiques suivantes : tension de 1 à 3 Volts, courant alternatif de forme sinusoïdale ou rectangulaire compris entre 50 et 1 000 Hz, et une plage de mesure minimale entre 0.1 et 30 kΩ. Le pont de mesure utilisé dans l'étude de validation permettait de mesurer l'inductance, la capacitance et la résistance jusqu'à des valeurs respectivement de 2 000 H, 2 000 µF et 2 MΩ, à des fréquences de 100 Hz ou 1 kHz, en utilisant des valeurs en parallèle ou en série. Pour les besoins de l'essai RET de corrosivité, les mesures sont enregistrées en résistance, à une fréquence de 100 Hz et à l'aide de valeurs en série. Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol du tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en kΩ/disque cutané (figure 1). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode exposée sous les pinces crocodiles sont indiquées à la figure 2. La pince maintenant l'électrode intérieure repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure est introduite dans le compartiment receveur de manière à reposer sur le fond de celui-ci. La distance entre la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (figure 2), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue. Par conséquent, la distance entre l'électrode intérieure et le disque cutané doit être constante et minimale (1 à 2 mm).

23. Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 kΩ, ceci peut être dû au fait que des restes du produit chimique testé couvrent la surface épidermique du disque de peau. On peut essayer de retirer davantage de produit chimique testé, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ. On élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

24. Les caractéristiques et dimensions de l'appareil d'essai et de la procédure expérimentale peuvent avoir une incidence sur les valeurs de RET obtenues. Le seuil de corrosivité de 5 kΩ a été défini sur la base des données obtenues à partir de l'appareil et de la procédure spécifiques décrits dans cette Ligne

directrice. Avec un autre équipement ou dans des conditions d'essai différentes, les valeurs de seuil et de contrôle peuvent être différentes. Par conséquent, il est nécessaire d'étalonner la méthodologie et la valeur de seuil de résistance en testant différentes substances d'épreuve de compétence, choisis parmi ceux utilisés dans l'étude de validation (8)(9), ou dans des classes chimiques équivalentes à celles des substances étudiées. Un ensemble de substances d'épreuve de compétence est présentée au tableau 1.

Méthodes avec fixation d'un colorant

25. L'exposition à certains produits chimiques non corrosifs peut entraîner une réduction de la résistance sous la valeur de seuil de 5 k Ω , permettant ainsi le passage d'ions à travers le *stratum corneum*, ce qui réduit ainsi la résistance électrique (9). Par exemple, les substances organiques neutres et les substances tensio-actives (détergents, émulsifiants et autres agents de surface) peuvent évacuer les lipides de la peau et accroître la perméabilité aux ions de la barrière cutanée. En conséquence, si les valeurs de RET obtenues avec ces produits chimiques sont inférieures à, ou proches de, 5 k Ω , en l'absence de toute lésion visible sur les disques cutanés, une étude de pénétration d'un colorant doit être menée sur les tissus traités et de contrôle, afin de déterminer si ces valeurs de RET résultent d'une perméabilité accrue ou d'une corrosion de la peau (7) (9). S'il s'agit d'une corrosion, autrement dit si le *stratum corneum* est rompu, le colorant sulforhodamine B appliqué à la surface de la peau pénètre rapidement et teinte les tissus sous-jacents. Ce colorant reste stable au contact d'un large éventail de substances et n'est pas affecté par la procédure d'extraction décrite ci-après.

Application et élimination du colorant Sulforhodamine B

26. Après l'essai de RET, le sulfate de magnésium est évacué du tube et la peau est soigneusement examinée. Si aucune lésion majeure n'est visible (par exemple une perforation), 150 μ L d'une dilution à 10 % (p/v) de sulforhodamine B (Acid Red 52 ; C.I. 45100 ; numéro CAS 3520-42-1) dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque pendant 2 heures. Les disques cutanés sont lavés ensuite sous un jet d'eau courante à température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire ou non fixé. Chaque disque cutané est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire ou non fixé. Après avoir répété l'opération de rinçage, on enlève les disques cutanés et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C.

27. Après incubation, chaque disque de peau est retiré et jeté, et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 210 °C (force centrifuge relative $\sim 175 \times g$). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

Calcul de la teneur en colorant

28. La teneur de chaque disque en colorant sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (9) (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 12 nm = 8.7×10^4 ; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau à l'aide d'une courbe-étalon appropriée et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés.

Critères d'acceptabilité

29. Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les plages acceptables pour la méthode en laboratoire

d'essai. Les plages acceptables de valeur de résistance pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes :

Contrôle	Substance	Plage de résistance (kΩ)
Positif	Acide chlorhydrique 10 M	0.5 – 1.0
Négatif	Eau distillée	10 – 25

30. Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la plage acceptable pour la méthode. Les plages acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont indiquées dans le tableau suivant :

Contrôle	Substance	Plage de teneur en colorant (µg/disque)
Positif	Acide chlorhydrique 10 M	40 – 100
Négatif	Eau distillée	15 – 35

Interprétation des résultats

31. La valeur seuil de RET qui permet de distinguer les produits chimiques corrosifs des produits non corrosifs a été déterminée lors de l'optimisation de la méthode d'essai, testée durant une phase de pré-validation, puis confirmée dans le cadre d'une étude formelle de validation.

32. Le modèle prédictif de la méthode d'essai de RET sur épiderme de rat (9) (19), associé au système de classification du SGH de l'ONU (1), est le suivant :

On considère que le produit chimique testé est non corrosif pour la peau :

- i) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique testé est supérieure à 5 kΩ, ou
- ii) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique testé est inférieure ou égale (\leq) à 5 kΩ, et
 - que les disques de peau ne montrent aucune lésion manifeste (par exemple une perforation), et
 - que la teneur moyenne en colorant du disque est inférieure ($<$) à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement (pour connaître les plages acceptables, se reporter au paragraphe 30).

On considère que le produit chimique testé est corrosif pour la peau :

- i) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique testé est inférieure ou égale (\leq) à 5 kΩ, et que les disques de peau montrent des lésions manifestes (par exemple une perforation), ou
- ii) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique testé est inférieure ou égale (\leq) à 5 kΩ, et
 - que les disques de peau ne montrent aucune lésion manifeste (par exemple une perforation), mais
 - que la teneur moyenne en colorant du disque est supérieure ou égale (\geq) à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement (pour connaître les plages acceptables, se reporter au paragraphe 30).

33. Une expérience réalisée à l'aide d'au moins trois répliqués de disques de peau devrait suffire pour tester un produit chimique dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents répliqués et/ou une RET égale à $5 \pm 0.5 \text{ k}\Omega$, une seconde expérience indépendante est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premiers.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Les valeurs de résistance ($\text{k}\Omega$) et les valeurs de teneur en colorant ($\mu\text{g}/\text{disque}$), s'il y a lieu, pour le produit chimique testé et pour les contrôles positifs et négatifs doivent être présentées sous forme de tableau, et inclure les données de chaque répliquat de disque pour chaque expérience et les valeurs moyennes \pm écart-type. Toutes les expériences reproduites doivent être consignées. Les lésions observées sur les disques de peau doivent être enregistrées pour chaque produit chimique testé.

Rapport d'essai

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

Produit chimique testé et substances de contrôle :

Substance mono-constituant

- Identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

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 ;
- Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- Source et numéro de lot si disponible ;
- Traitement du produit chimique testé ou de la substance de contrôle avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage) ;
- Stabilité du produit chimique testé, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Animaux d'essai :

- souche et sexe ;
- âge au moment du prélèvement de peau ;
- source, conditions d'hébergement, alimentation, etc. ;
- détails de la préparation de la peau.

Conditions de l'essai :

- courbes d'étalonnage de l'appareil d'essai ;

- courbes d'étalonnage des performances de l'essai de fixation d'un colorant, passe-bande utilisé pour mesurer les valeurs de DO, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), le cas échéant ;
- détails de la procédure d'essai utilisée pour les mesures de la RET ;
- détails de la procédure d'essai utilisée pour l'évaluation de la fixation du colorant, le cas échéant ;
- doses d'essai utilisées, durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition ;
- détails de la procédure de lavage utilisée après la période d'exposition ;
- nombre de réplicats de disques de peau utilisés par produit chimique testé et par substance de contrôle (négatif et positif) ;
- description de toute modification de la procédure d'essai ;
- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative) :
 - i) acceptabilité des valeurs de RET des contrôles positif et négatif (en k Ω) par rapport aux plages de résistance des contrôles positif et négatif,
 - ii) acceptabilité des valeurs de la teneur en colorant des contrôles positif et négatif (en $\mu\text{g}/\text{disque}$) par rapport aux plages de teneur en colorant des contrôles positif et négatif,
 - iii) acceptabilité des résultats de l'essai par rapport à la variabilité historique entre réplicats de disques de peau ;
- description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués.

Résultats :

- présentation sous forme de tableau des valeurs de RET et de l'essai de fixation d'un colorant (le cas échéant), pour chaque produit chimique testé et substance de contrôle, pour chaque expérience et chaque répliat de disque cutané (pour chaque animal et chaque échantillon de peau), moyennes, écarts-types et écarts-types relatifs ;
- description de tous les effets observés ;
- classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (ONU). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Étiquetage des Produits Chimiques (SGH), Seconde Edition Révisée, ONU New York et Genève, disponible à l'adresse suivante : [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html].
- (2) OCDE. (2015). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques (No. 404) : Effet Irritant/Corrosif Aigu sur la Peau. Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- (3) OCDE. (2015). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques (No. 431.) : Corrosion Cutanée *In Vitro* : Essai sur Modèle de Peau Humaine. Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- (4) OCDE (2015), Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques (No. 435.) : Méthode d'Essai *In Vitro* sur Membrane d'Étanchéité pour la Corrosion Cutanée. Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- (5) OCDE. (2015). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Lignes Directrices pour les Essais de Produits Chimiques (No. 439.) : Irritation Cutanée *In Vitro* : Essai sur Epiderme Humain Reconstitué. . Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- (6) OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 203.) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., et Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., et Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.in Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., et Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.

- (11) ICCVAM. (Comité de Coordination Interagences sur la Validation des Méthodes Alternatives). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis, Disponible à l'Adresse Suivante : [<http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>].
- (12) CEVMA (CE). (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC10), 3 avril 1998, Disponible à l'Adresse Suivante : [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
- (13) CEVMA. (1998), ECVAM News & Views. *ATLA* 26, 275-280.
- (14) ICCVAM (Comité de Coordination Interagences sur la Validation des Méthodes Alternatives). (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKINTM (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis, Disponible à l'Adresse Suivante : [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf].
- (15) Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 218, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., et Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test - Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., et Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxic.in Vitro* 6, 191-194.
- (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. et Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.
- (19) TER SOP. (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No. 115.), Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test. Available at: [<http://www://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu.html>].
- (20) OECD. (2005). Environment, Health and Safety Publications, 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 Economc, Paris.

Figure1 : Appareil pour l'essai de RET sur peau de rat

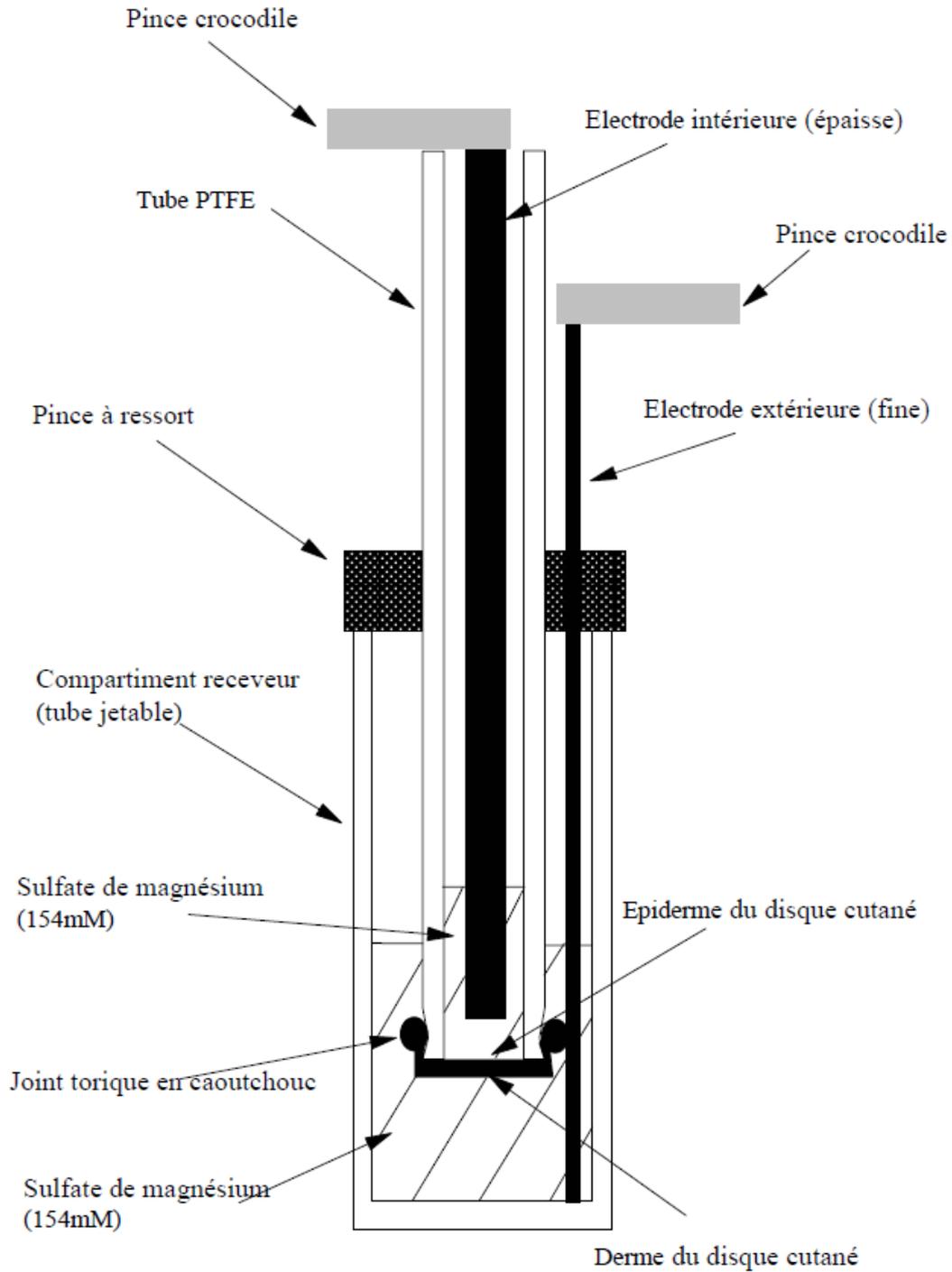
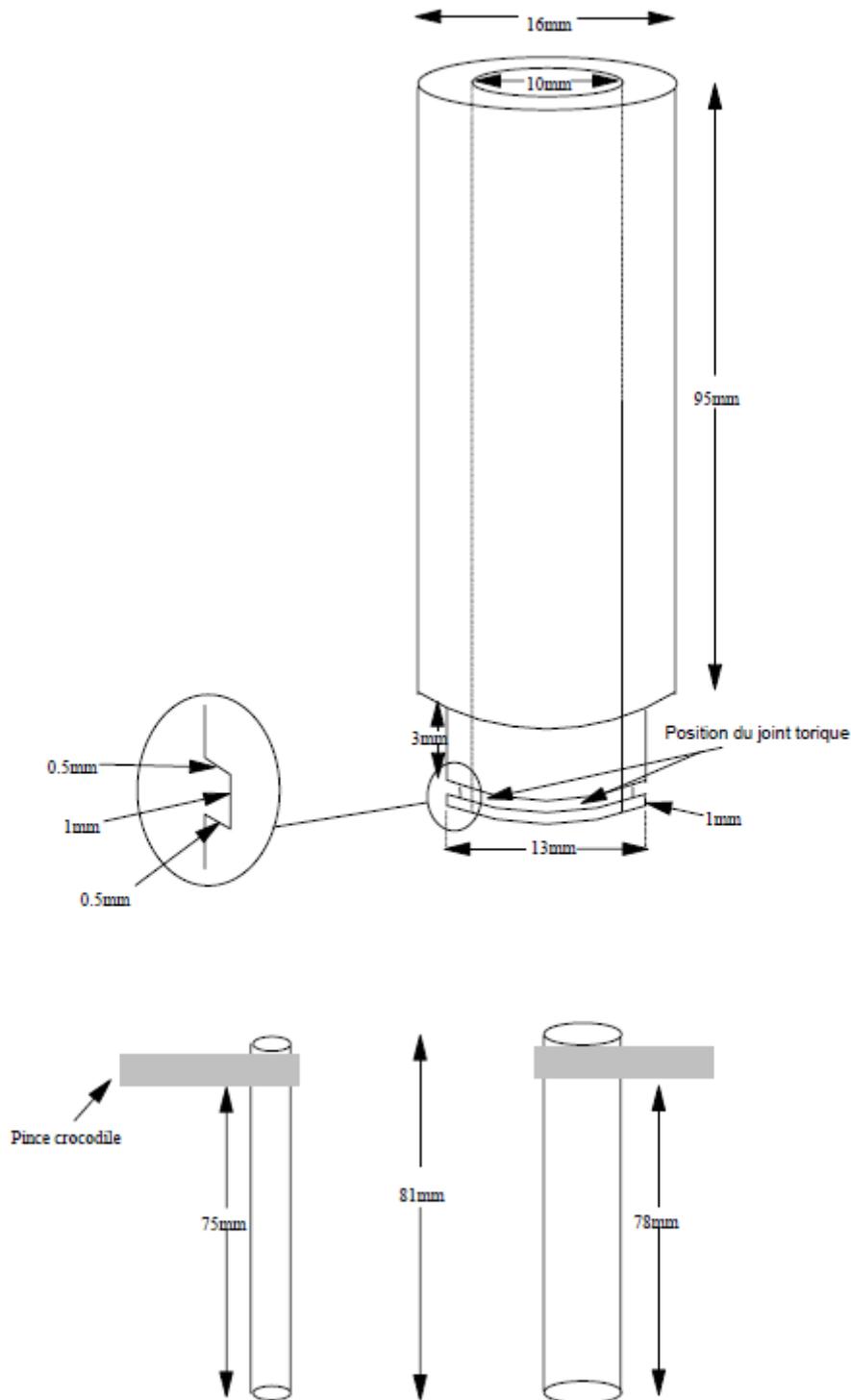


Figure 2 : Dimensions du tube PTFE (polytétrafluoroéthylène), des tubes receveurs et des électrodes utilisés



Facteurs importants pour l'appareil ci-dessus :

- diamètre intérieur du tube PTFE ;
- longueur des électrodes par rapport au tube PTFE et au tube receveur : le disque cutané ne doit pas être en contact avec les électrodes, et une longueur standard d'électrode doit être en contact avec la solution de sulfate de magnésium ;
- quantité de solution de sulfate de magnésium dans le tube receveur : la profondeur de liquide, par rapport au niveau dans le tube PTFE, doit être telle qu'indiquée dans la figure 1 ;
- fixation du disque cutané sur le tube PTFE : la résistance électrique doit être véritablement une mesure des propriétés de la peau.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

C : corrosif

Concordance : mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats catégoriels. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de « précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques testés qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques testés (20).

Corrosion cutanée *in vivo* : survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique testé pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

DO : densité optique

Expérience : consiste à tester en parallèle un produit chimique sur au minimum trois réplicats de disques cutanés.

Expérience qualifiée : expérience qui remplit les critères d'acceptabilité en ce qui concerne les contrôles positif et négatif définis dans le mode opératoire normalisé. Dans le cas contraire, l'essai est considéré comme non qualifié.

Fiabilité : mesure dans laquelle 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 (20).

IATA : Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation (*Integrated Approaches to Testing and Assessment* en anglais)

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

NC : non corrosif

Normes de performance : normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : (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 fiabilité et de précision similaires à ceux obtenus avec 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.

Pertinence : description de la relation entre la méthode d'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. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

Précision : degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

Produit chimique : peut être une substance ou un mélange

Résistance électrique transcutanée (RET) : mesure de l'impédance électrique de la peau, exprimée par une valeur de résistance en kilo-Ohms. Il s'agit d'une méthode simple et fiable permettant d'évaluer la fonction de barrière de la peau, par l'enregistrement du passage des ions à travers la peau à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone.

Sensibilité : proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

SGH de l'ONU [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 le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

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

Substance mono-constituant : une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle le constituant principal est présent à hauteur de 80% au moins (m/v).

Substance multi-constituant : une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10% (m/v) and inférieure ou égale à 80% (m/v). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles.. une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

Produit chimique testé : désigne ce qui est testé (substance ou mélange).

UVCB : substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.