



Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 431
Corrosion cutanée *in vitro* :
Essai sur modèle de peau humaine

18 juin 2019

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

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

Corrosion Cutanée In Vitro : Essai Sur Modèle De Peau Humaine

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). La présente Ligne directrice 431 mise à jour 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). Elle permet aussi une sous-catégorisation partielle des produits chimiques corrosifs.

2. Traditionnellement, l'évaluation du potentiel de corrosion cutanée par les produits chimiques 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 431 (3), deux autres méthodes d'essai in vitro de potentiel de corrosion cutanée par les produits chimiques ont été validées et adoptées ; elles constituent les Lignes directrices de l'OCDE 430 (3) et 435 (4). Par ailleurs, la Ligne directrice 439 (5) in vitro a été adoptée pour le volet « irritation cutanée ». 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 fait appel à un épiderme humain reconstitué (obtenu à partir de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain) qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques des couches supérieures

de la peau humaine, c'est-à-dire de l'épiderme. Cette Ligne directrice a été initialement adoptée en 2004, puis mise à jour en 2013, 2016 et 2019 pour y inclure deux méthodes d'essai supplémentaires utilisant les modèles d'épiderme humain reconstitué. La Ligne directrice a aussi été mise à jour en 2015 pour soutenir la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs, et pour y introduire la référence au Document Guidance sur IATA et une procédure alternative pour mesurer la viabilité cellulaire.

4. Cette Ligne directrice porte sur cinq méthodes d'essai validées utilisant des modèles d'épiderme humain reconstitué disponibles dans le commerce comme décrit plus bas. Des études de prévalidation (7), suivies d'une étude formelle de validation pour l'évaluation de la corrosion cutanée (8) (9) (10), ont été menées (11)(12) sur deux de ces méthodes d'essai disponibles dans le commerce, le modèle standard (SM) EpiSkin™ et l'essai de corrosion cutanée (SCT) EpiDerm™ (EPI-200) (désignées comme les méthodes de référence validées – MRV- dans le texte qui suit EpiSkin™ =VRM1 . EpiDerm™=VRM2). Sur la base des résultats de ces études, il est désormais recommandé que ces deux MRV puissent servir, à des fins réglementaires, à distinguer entre les produits chimiques corrosifs (C) et les produits chimiques non corrosifs (NC), et que la méthode EpiSkin™ puisse également être utilisée pour sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs (13) (14) (15). Deux autres méthodes d'essai d'irritation cutanée in vitro sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné par la suite des résultats analogues à la MRV EpiDerm™ SCT selon une validation fondée sur les normes de performance (16) (17) (18). Il s'agit des méthodes SkinEthic™ RHE et epiCS® (précédemment connue sous le nom EST-1000), qui peuvent aussi servir à des fins réglementaires pour distinguer les produits chimiques corrosifs des produits chimiques non corrosifs (19) (20). Des études post-validation réalisées entre 2012 et 2014 par les producteurs des modèles d'épiderme humain reconstitué, à l'aide d'un protocole affiné corrigeant les interférences causées par la réduction non spécifique du MTT par les produits chimiques testés, ont amélioré les performances, s'agissant aussi bien de la distinction entre produits chimiques corrosifs et non corrosifs que pour soutenir la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs (21)(22). Des analyses statistiques sur des données collectées après la validation et générées sur EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS® ont permis d'identifier des modèles de prédiction alternatifs qui améliorent leur capacité de prédiction pour la sous-catégorisation (23). Enfin, le LabCyte EPI-MODEL24 est un autre test in vitro de corrosion de la peau disponible dans le commerce qui a été démontré comme étant scientifique similaire aux VRM et peut donc être utilisé à des fins réglementaires pour distinguer des substances corrosives des non-corrosives ainsi comme support à la sous-catégorisation des corrosifs (40) (41) (42) (43).

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai in vitro de corrosivité cutanée sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée autre que les 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 les MRV, conformément aux normes de performance figurant dans la présente Ligne directrice (annexe 1). 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 (24) établies conformément au Document Guide de l'OCDE sur la validation No. 34 (25). L'acceptation mutuelle des données n'est garantie que dans la mesure où les méthodes d'essai nouvelles ou mises à jour conformément aux normes de performances, ont fait l'objet d'un examen afin d'être incluses dans la Ligne directrice. Les méthodes d'essai figurant dans la présente Ligne directrice peuvent s'utiliser pour répondre

aux exigences des pays en matière d'essais in vitro de corrosion cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données.

DÉFINITIONS

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

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. La présente Ligne directrice permet d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1). Cette Ligne directrice autorise en outre à sous-catégoriser les substances et mélanges corrosifs, en les classant dans la sous-catégorie facultative 1A telles que définies par le SGH de l'ONU (1), ou dans les sous-catégories 1B et 1C combinées (21)(22). Une limite de cette Ligne directrice est qu'elle ne permet pas d'établir de distinction entre les sous-catégories de corrosivité cutanée 1B et 1C du SGH de l'ONU (1), en raison du nombre limité de produits chimiques corrosifs in vivo de sous-catégorie 1C bien connus. Les cinq méthodes d'essai dans cette Ligne directrice sont à même de permettre une sous-catégorisation (catégories 1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives (NC)).

8. Un large éventail de produits chimiques, constitué principalement de substances individuelles, a été testé durant les études de validation pratiquée en appui des méthodes d'essai proposées dans cette Ligne directrice. La base de données empiriques pour la validation de l'étude conduite pour l'identification des produits non corrosifs face aux produits corrosifs totalisait 60 produits chimiques couvrant une grande variété de classes chimiques (8) (9) (10). Les tests visant à démontrer la sensibilité, la spécificité, la précision et la reproductibilité intra-laboratoire utilisant 79 à 80 produits chimiques couvrant aussi une large gamme de classes chimiques et leurs résultats ont été examinés par l'OCDE (21) (22) (23). D'après l'ensemble des données disponibles, la 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. 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 traitement préalable de l'échantillon n'est nécessaire. 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 ces méthodes 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 dans (26)), la LD ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de mélanges en question. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (8) (9) (10). 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 orientation, il convient de considérer si les résultats de ces essais donneront des résultats scientifiquement significatifs. 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 (9) (10). Bien qu'il soit envisageable de tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle Ligne directrice ne permet pas de tester les produits de ce type.

9. Les produits chimiques testés absorbant la lumière dans la même gamme que le MTT formazan et les produits chimiques testés capable de réduire de façon directe le colorant vital MTT (en MTT formazan) peuvent interférer avec les mesures de viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour effectuer la correction de ces interférences. Le type de témoins adaptés qui peuvent être requis peut varier en fonction du type d'interférences produites par le produit chimique testé et de la procédure mise en œuvre pour mesurer le MTT formazan (voir paragraphes 25-31).

10. Si la présente LD 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* et, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (5). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de consulter le Document Guide No. 203 sur les Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation- IATA en anglais (6). Cette approche IATA prévoit la conduite d'essais *in vitro* de corrosion cutanée (tels que décrits dans la présente Ligne directrice) et d'irritation cutanée avant d'envisager des essais sur des animaux vivants. Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Le produit chimique testé est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un stratum corneum multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, semblables à celles que l'on observe *in vivo*.

12. La méthode d'essai sur épiderme humain reconstitué part du principe que les substances corrosives sont capables de pénétrer dans le stratum corneum (couche cornée) par diffusion ou érosion, et sont cytotoxiques pour les cellules des couches sous-jacentes. La viabilité cellulaire est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium ; numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (27). Les substances corrosives sont mises en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé (voir paragraphes 31 et 32). Dans la pratique, les méthodes d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué se sont révélées fiables pour prédire la corrosion cutanée *in vivo* sur le lapin selon la Ligne directrice 404 de l'OCDE (2).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'une des cinq méthodes validées d'essai sur épiderme humain reconstitué conformes à la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze produits énumérés au tableau 1. S'ils utilisent une méthode de sous-classification, l'exactitude de la sous-catégorisation doit également être démontrée. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 1 serait indisponible, ou dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (24)),

cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées in vivo et in vitro sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés.

Table 1. Liste des Substances d'épreuve de compétence¹

Substance	CASRN ²	Chemical Class	UN GHS Cat. Based on <i>in vivo</i> results ³	UN GHS Cat. Based on <i>in vitro</i> results ⁴	Mean cell viability for VRMs				Physical State
					VRM1		VRM2		
					3 min	60 min	3 min	60 min	
Substances corrosives <i>in vivo</i> de sous-catégorie 1A									
Acide bromoacétique	79-08-3	acide organique	1A	(3) 1A	3	2.8	3.2	2.8	S
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	acide inorganique	1A	(3) 1A	2.4	4.2	4.4	10.1	L
Phénol	108-95-2	phénol	1A	(3) 1A	29.8	21.8	22.6	13.5	S
Chlorure de dichloroacétyle	79-36-7	électrophile	1A	(3) 1A	5.6	6.3	1.3	1.4	L
Combinaison de substances corrosives <i>in vivo</i> de sous-catégorie 1B-et-1C									
Acide glyoxylique monohydraté	563-96-2	acide organique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	110.4	22.5	90.4	3.1	S
Acide lactique	598-82-3	acide organique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	80.2	9.4	90	3.5	L
Ethanolamine	141-43-5	base organique	1B	(3) 1B-et-1C	66.2	40.3	69.7	9.3	Viscous
Acide chlorhydrique	7647-01-0	acide inorganique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	69.3	5.7	80.8	9	L
Substances non corrosives <i>in vivo</i>									
Bromure de phénylène	103-63-9	électrophile	NC	(3) NC	141	117.2	112.5	71.2	L
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	(3) NC	116.8	120.6	105.7	88.2	S
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	(3) NC	136.7	150.4	85.4	81.6	L
Acide laurique	143-07-7	acide organique	NC	(3) NC	102	117.4	90.7	64.4	S

Notes :

Abréviations : 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 EpiSkin™ = VRM1 EpiDerm™ = VRM2 ; NC : non corrosif.

¹Les 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 les études de validation EpiSkin™ et EpiDerm™ du CEVMA (8) (9) (10) et dans les études post-validation s'appuyant sur les données fournies par les développeurs de EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS®. Sauf indication contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté qui était le leur lors de l'achat auprès de la source commerciale (8) (10). 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 les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir ; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation ; (iii) ont une structure chimique bien définie ; (iv) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV ; (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 prédictions *in vitro* ont été obtenues grâce aux cinq méthodes (MRV) couvertes par la LD 431; pour le phénol, bien que le LabCyte EPI-MODEL24 ait généré des résultats légèrement discordants à travers les passages, c.-à-d. 1A-1BC-1BC; d'autres méthodes ont atteint ces classifications dans la validation ou la post-validation réalisés par les développeur de la méthode d'essai.

⁵Les valeurs de viabilité obtenues dans l'étude de validation pour la corrosion de la peau du CEVMA n'ont pas été corrigées pour la réduction MTT directe (aucun témoins sur tissus morts n'a été réalisé lors de l'étude de validation). Cependant, les données post-validation obtenues par le développeur de la méthode d'essai qui sont présentées dans ce tableau ont été obtenues avec des témoins adaptés (23).

14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. 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 démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera 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 des tissus à intervalles réguliers.

PROCÉDURE

15. Les paragraphes qui suivent offrent une description générique des éléments et des procédures des méthodes d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué traitées dans cette Ligne directrice. Les modèles d'épiderme humain reconstitué considérés comme scientifiquement valides à utiliser dans cette Ligne directrice, à savoir les modèles EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE et epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33)(40)(41), sont disponibles dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour ces quatre modèles d'épiderme humain reconstitué (34) (35) (36)(37)(42), et les principaux éléments de leur méthode d'essai sont résumés à l'annexe 2. Il est recommandé de consulter le mode opératoire normalisé pertinent lors de la mise en œuvre et de l'utilisation d'une de ces méthodes en laboratoire. Les essais réalisés avec les cinq méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué figurant dans cette Ligne directrice doivent respecter les éléments suivants :

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

Conditions générales

16. L'épithélium est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes sous un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière doit être démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI50) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE50) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée (voir paragraphe 18). Le modèle d'épiderme humain reconstitué doit présenter des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le stratum corneum pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle doit être exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique.

*Conditions fonctionnelles**Viabilité*

17. La quantification de la viabilité cellulaire est mesurée au moyen du colorant MTT (27). Les cellules viables du modèle d'épiderme humain reconstitué réduisent le colorant vital MTT en un précipité bleu de sel de formazan., qui est ensuite extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou d'un solvant similaire). La densité optique du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieure à 0.1. Le MTT formazan extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance standard (DO), ou une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (38). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent faire en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le contrôle négatif. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif doit être établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité des valeurs de densité optique pour les témoins négatifs des cinq méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué validées figurant dans cette Ligne directrice sont indiquées dans le tableau 2. L'utilisateur de spectrophotométrie HPLC-UPLC devra utiliser la plage de densité optique des témoins négatifs fournie au tableau 2 comme critère d'acceptabilité du témoin négatif. Il est démontré que les tissus traités par le contrôle négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de DO similaires) tout au long de la période d'exposition.

Table 2. Plages d'acceptabilité pour la DO du contrôle négatif pour contrôler la qualité du lot

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	≥ 0.7	≤ 2.5

Fonction de barrière

18. Le stratum corneum et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de certains produits chimiques marqueurs cytotoxiques tels que le SDS ou le Triton X-100, cette capacité étant évaluée par la CI50 et le TE50 (voir tableau 3). La fonction de barrière de chaque lot de modèle de peau reconstituée doit être démontrée par le développeur/fournisseur au moment de la fourniture des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 21).

Morphologie

19. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure multicouche semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant un stratum basale, un stratum spinosum, un stratum granulosum et un stratum corneum)

ainsi qu'un profil lipidique semblable à celui de l'épiderme humain. L'examen histologique de chaque lot de modèle de peau reconstituée utilisé, démontrant une morphologie adéquate des tissus, doit être fourni par le développeur/fournisseur au moment de la livraison des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 21).

Reproductibilité

20. Les utilisateurs des méthodes d'essai doivent démontrer la reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des contrôles positifs et négatifs. De plus, il ne faut utiliser la méthode d'essai que si le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué fournit des données démontrant sa reproductibilité dans le temps à l'aide de produits chimiques corrosifs et non corrosifs figurant par exemple sur la liste des produits chimiques d'épreuve (tableau 1). Si l'on utilise une méthode d'essai à des fins de sous-catégorisation, il convient de démontrer aussi la reproductibilité de cette sous-classification.

Contrôle de qualité

21. Le modèle d'épiderme humain reconstitué ne doit être utilisé que si le développeur/fournisseur démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 17), à la fonction de barrière (paragraphe 18) et à la morphologie (paragraphe 19). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Seuls les résultats obtenus à l'aide de lots de tissus ayant subi avec succès le contrôle de qualité pourront être retenus pour prédire de façon fiable la classification de la corrosivité. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI₅₀ ou TE₅₀ est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les quatre méthodes d'essai validées sont indiquées dans le tableau 3.

Table 3. Critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM) (18 heures de traitement par SDS) (33)	CI ₅₀ = 1.0 mg/mL	CI ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (Triton X-100 à 1 %)(34)	TE ₅₀ = 4.0 heures	TE ₅₀ = 8.7 heures
SkinEthic™ RHE (Triton X-100 à 1 %)(35)	TE ₅₀ = 4.0 heures	TE ₅₀ = 10.0 heures
epiCS® (Triton X-100 à 1 %)(36)	TE ₅₀ = 2.0 heures	TE ₅₀ = 7.0 heures
LabCyte EPI-MODEL24 SCT (18 heures de traitement avec SDS)	CI ₅₀ = 1.4mg/ml	CI ₅₀ = 4.0 mg/ml

Application des substances d'essai et de contrôle

22. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par période d'exposition pour chaque produit chimique testé et substance de contrôle. Pour les produits chimiques liquides comme pour les produits chimiques solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum 70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ou 30 mg/cm^2 . Selon les méthodes, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application de produits chimiques solides, afin d'assurer un bon contact entre le produit chimique et la surface de l'épiderme (34) (35) (36) (37)(42). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. La méthode d'application doit convenir au produit chimique testé (voir par exemple les références 34 à 37). À la fin de la période d'exposition, l'épiderme doit être nettoyé avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0.9 %. En fonction de la méthode validée utilisée, deux ou trois périodes d'exposition sont nécessaires par produit chimique testé (pour les cinq modèles validés d'épiderme humain reconstitué : 3 min et 1 heure ; pour EpiSkinTM, une période d'exposition supplémentaire de 4 heures). Selon la méthode d'essai utilisée et la période d'exposition évaluée, la température d'incubation peut varier entre la température ambiante et 37°C.

23. Des contrôles négatifs et positifs sont utilisés simultanément pour chaque épreuve afin de démontrer que la viabilité (dans le cas des contrôles négatifs), la fonction de barrière et la sensibilité cellulaire qui en résulte (dans le cas du contrôle positif) se situent dans une fourchette de valeurs admissibles, définie d'après les résultats historiques. Les substances de contrôle positif recommandées sont l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué mis en œuvre (voir annexe 2 et les modes opératoires pertinents pour les détails). Il convient de noter que l'hydroxyde de potassium 8N est un agent réducteur direct du MTT, qui peut nécessiter l'utilisation de contrôles adaptés décrits aux paragraphes 25 et 26. Les substances de contrôle négatif recommandées sont une solution NaCl à 0.9 % (p/v) ou de l'eau.

Mesures de la viabilité cellulaire

24. Il convient de recourir au test MTT, qui est un essai quantitatif, pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette Ligne directrice (27). L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (0.3, 0.5 ou 1 mg/mL voir annexe 2 et modes opératoires pertinents pour les détails) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (par exemple isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ± 30 nm au maximum, ou par une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (voir paragraphes 30 et 31) (38).

25. Les produits chimiques testés sont susceptibles d'interférer avec le test MTT, par réduction directe du MTT en formazan bleu, 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 densité optique que le formazan (570 ± 30 nm, produits chimiques principalement bleus et violets). Des contrôles ou témoins supplémentaires doivent être utilisés pour détecter et corriger les interférences potentielles avec ces produits chimiques testés, tel qu'un témoin de réduction non-spécifique du MTT (MTT NS) et un témoin coloré non-spécifique (T NS) (voir paragraphes 26 à 30). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique testé n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme, et est donc présent dans les tissus lors de

l'essai de viabilité au MTT. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des méthodes d'essai (34) (35) (36) (37) (42).

26. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique testé à un milieu MTT fraîchement préparé (34) (35) (36) (37) (42). Si le mélange de MTT et de produit chimique testé (ou la suspension testée pour les produits chimiques testés insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique testé est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles d'épithélium humain reconstruit non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par HPLC/UPLC-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. Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la méthode d'essai complète de corrosion de la peau. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT (%viabilitétest) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%MTT NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilitétest] - [%MTT NS].

27. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques testés colorés ou qui deviennent colorés en contact avec l'eau ou l'isopropanol, et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, une analyse de spectre est menée sur les produits chimiques dans l'eau (environnement au moment de l'exposition) et/ou dans l'isopropanol (solvant d'extraction). Si le produit chimique testé dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570 ± 30 nm, alors on considère que le produit chimique testé interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 30 et 31). 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 de corrosion de la peau, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants (Tvivants NS). Le témoin Tvivants NS est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique testé coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin Tvivants NS 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 (%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 en parallèle de l'essai à corriger (%Tvivants NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilitétest] - [%Tvivants NS].

28. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une réduction directe du MTT (voir paragraphe 26) et une interférence de couleurs (voir paragraphe 27), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins MTT NS et Tvivants NS décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques testés foncés (bleus, violets, noirs, par

exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 26. Les produits chimiques testés 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 MTT NS peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT 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 Tvivants NS 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 (Tmorts NS) doit être préparé. 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 MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin Tmorts NS par produit chimique testé suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT 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 moins % Tvivants NS 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 (%Tmorts NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilitétest] - [%MTT NS] - [%Tvivants NS] + [%Tmorts NS].

29. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre. Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce, avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires. Les mesures d'absorbance standard (DO) au moyen d'un spectrophotomètre sont pertinentes pour évaluer les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques testés colorés quand la DO des extraits de tissus traités par le produit chimique testé sans correction pour la réduction directe du MTT et/ou pour les interférences de couleur sont dans la plage de linéarité du spectrophotomètre ou quand le pourcentage de viabilité non-corrigée obtenu avec le produit chimique testé le classe déjà comme corrosif (voir paragraphes 35 et 36). Néanmoins, les résultats pour les produits chimiques testés indiquant % MTT NS et/ou Tvivants NS $\geq 50\%$ du témoin négatif doivent être interprétés avec précaution.

30. Pour les produits chimiques testés colorés qui ne sont pas compatibles avec la mesure de l'absorbance standard (DO) à cause de leur forte interférence avec l'essai de MTT, peuvent être évalués par une procédure de HPLC/UPLC-spectrophotométrie (voir paragraphe 31) (38). Le système HPLC/UPLC permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (38). Pour cette raison, les témoins Tvivants NS et Tmorts NS ne sont pas nécessaires pour la procédure HPLC/UPLC-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique testé. Les témoins MTT NS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique testé soit un réducteur direct du MTT, ou que la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 26). Lorsqu'une procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est

calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique testé avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques testés réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : % viabilité test moins % MTT NS. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en-dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

31. La procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (38). Étant donné la diversité des équipements de HPLC/UPLC -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 HPLC/UPLC -spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, 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 (38) (39). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'annexe 4. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'annexe 4 ont été remplis, l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente Ligne directrice d'essai.

Critères d'acceptabilité

32. Pour chaque méthode d'essai recourant à des modèles d'épiderme humain reconstitué valides, les tissus traités par le contrôle négatif présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus qui respecte les plages d'acceptabilité du tableau 2 et qui ne doit pas être inférieure aux limites historiques. Les résultats obtenus pour les tissus traités par le contrôle positif, c'est-à-dire l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N, doivent montrer leur capacité à réagir à un produit chimique corrosif dans les conditions de la méthode d'essai (voir annexe 2 et modes opératoires pertinents pour les détails). La variabilité entre les répliquats de tissus pour les produits chimiques testés et/ou substances de contrôle doit se situer dans la plage acceptable pour chaque modèle validé d'épiderme humain reconstitué (voir annexe 2 et modes opératoires pertinents pour les détails) (par exemple la différence de viabilité entre les deux répliquats de tissus ne doit pas dépasser 30 %). Si le contrôle négatif ou positif inclus dans une épreuve sort de la plage d'acceptabilité, l'épreuve est considérée comme non qualifiée et doit être répétée. Si la variabilité des produits chimiques testés sort de la plage des valeurs admissibles, l'essai doit être répété.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

33. Les valeurs de DO obtenues pour chaque produit chimique testé doivent servir à calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif, dont la DO est fixée à 100 %. Dans le cas où la spectrophotométrie HPLC-UPLC est utilisée, le pourcentage de viabilité cellulaire est obtenue en calculant le pourcentage de MTT formazan au pic obtenu

avec les tissus vivants traités par le produit chimique testé par rapport au pic de MTT formazan obtenu avec le témoin négatif testé en parallèle. Les valeurs seuils du pourcentage de viabilité cellulaire qui établissent la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre les différentes sous-catégories de substances corrosives) sont définies ci-dessous aux paragraphes 35 et 36 pour chacune des méthodes d'essai traitées dans la présente Ligne directrice et doivent être utilisées pour interpréter les résultats.

34. Une seule expérience réalisée à l'aide d'au moins deux réplicats de tissus devrait suffire pour tester un produit chimique dont la classification obtenue est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats, une deuxième épreuve peut être envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

35. Le tableau 4 présente le modèle prédictif de la méthode d'essai de corrosion cutanée EpiSkin™ (9) (22) (34), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU (1) :

Table 4. Modèle prédictif d'EpiSkin™

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3, 60 et 240 minutes)	Prévision à considérer
< 35 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : Sous-catégorie facultative 1A *
≥ 35 % après 3 minutes d'exposition ET < 35 % après 60 minutes d'exposition OU ≥ 35 % après 60 minutes d'exposition ET < 35 % après 240 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : Combinaison des sous-catégories facultatives 1B et 1C
≥ 35 % après 240 minutes d'exposition	Produit chimique non corrosif

Note:

*) D'après les données produites pour évaluer l'utilité des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué à des fins de sous-catégorisation, environ 22 % des résultats de la méthode d'essai EpiSkin™ relevant de la sous-catégorie 1A pourraient en fait constituer des substances/mélanges de sous-catégories 1B ou 1C (surclassification) (voir annexe 3).

36. Le tableau 5 présente les modèles prédictifs des méthodes d'essai de corrosion cutanée EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) et epiCS® (16) (23) (37) et LabCyte EPI-MODEL24 (41)(42), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU (1)

Table 5. EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS® et LabCyte EPI-MODEL24 SCT

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60 minutes)	Prévision à considérer
ETAPE 1 pour EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS® et LabCyte EPI-MODEL24 SCT	
< 50 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET	Produit chimique corrosif
< 15 % après 60 minutes d'exposition	
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET	Produit chimique non corrosif
≥ 15 % après 60 minutes d'exposition	
ETAPE 2 pour EpiDerm™ SCT- pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 25 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 25 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ETAPE 2 pour SkinEthic™ RHE pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 18 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 18 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ETAPE 2 pour epiCS® pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 15 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 15 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ETAPE 2 pour LabCyte EPI-MODEL24 SCT pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
<15% après 3 minutes d'exposition	Sous catégories optionnelle 1A
≥ 15% après 3 minutes d'exposition	Une combinaison optionnelle des sous catégories 1B et 1C

Note:

*) D'après les données produites pour évaluer l'utilité des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué à des fins de sous-catégorisation, environ 29 %, 31% and 33% et 30% des résultats relevant de la sous-catégorie 1A pour les méthodes d'essai EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS® et LabCyte EPI-MODEL 24 SCT , respectivement pourraient en fait constituer des substances/mélanges de sous-catégories 1B ou 1C (surclassification) (voir annexe 3).

RÉSULTATS ET RAPPORT**Résultats**

37. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque produit chimique testé, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en répétant les expériences. En outre, les moyennes et les fourchettes de viabilité ainsi que les coefficients de variation entre les réplicats de tissus pour chaque essai doivent être consignés. Les interactions observées avec le réactif MTT pour les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques testés colorés seront signalées pour chaque produit chimique testé.

Rapport d'essai

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

Produits 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.

Modèle d'épiderme humain reconstitué et protocole utilisés ; justification de ce choix (le cas échéant)**Conditions de l'essai :**

- modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot) ;
- informations d'étalonnage de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), longueur d'onde et passe-bande (s'il y a lieu) utilisés pour quantifier le MTT formazan, et la plage de linéarité de cet appareil de mesure ;

- description de la méthode utilisée pour quantifier le MTT formazan ;
- description des spécifications du système de spectrophotométrie HPLC/UPLC, s'il y a lieu ;
- informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative) :
 - i) viabilité ;
 - ii) fonction de barrière ;
 - iii) morphologie ;
 - iv) contrôles de qualité (CQ) du modèle ;
- références des données historiques du modèle utilisé, à savoir (liste non limitative) l'acceptabilité des données de contrôle de qualité faisant référence aux données historiques du lot ;
- démonstration de la compétence à exécuter la méthode d'essai, avant une utilisation régulière, au moyen des substances d'épreuve de compétence ;

Protocole de l'essai :

- description détaillée des procédures appliquées, y compris les procédures de lavage utilisées après la période d'exposition
- doses de produit chimique testé et de substance de contrôle ;
- durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition ;
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, s'il y a lieu;
- nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique testé et substance de contrôle (contrôle positif, contrôle négatif et, le cas échéant, réduction non spécifique du MTT et coloration non spécifique, témoin vivant non spécifique (Tvivant NS), témoin mort non spécifique (Tmort NS)), par temps d'exposition ;
- description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé ;
- description de toute modification apportée au protocole d'essai (y compris aux procédures de lavage).

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

- i) valeur moyenne des contrôles positifs et négatifs et plage d'acceptabilité par rapports aux données historiques;
- ii) variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les contrôles positifs et négatifs ;
- iii) variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour le produit chimique testé.

Résultats :

- présentation des résultats sous forme de tableau, pour chaque produit chimique testé et substance de contrôle, chaque période d'exposition, chaque épreuve et chaque mesure de réplicat, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, le pourcentage de viabilité cellulaire, le pourcentage moyen de viabilité cellulaire, les différences entre les réplicats, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu;
- S'il y a lieu, les résultats des contrôles utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques testés colorants, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, % MTT NS, % Tvivant NS, % Tmort NS, les différences entre les réplicats de tissus, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu, et le pourcentage final corrigé de viabilité cellulaire ;
- description de tous autres 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) des Nations Unies, Cinquième Edition Révisée*, ONU New York et Genève. Disponible à l'adresse : [http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html].
- (2) OCDE. (2015). *Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (n° 404) : Effet Irritant/Corrosif Aigu sur la Peau*. Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Paris.
- (3) OCDE. (2015). *Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (n° 430) : Corrosion Cutanée In Vitro : Essai de Résistance Electrique Transcutanée (TER)*. Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Paris.
- (4) OCDE. (2015). *Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (n° 435) : Méthode d'Essai In Vitro sur Membrane d'Étanchéité pour la Corrosion Cutanée*. Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Paris.
- (5) OCDE. (2015). *Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (n° 439) : Irritation Cutanée In Vitro : Essai sur Epiderme Humain Reconstitué*. Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Paris.
- (6) OECD. (2014). *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 203)*. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Les documents OCDE sont en Anglais à partir de là.
- (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., and Worth A.P. (1998). « The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. », *Toxicol. 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., Holzhutter 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. » *Toxicol. In Vitro* 12, 483-524.
- (10) Liebsch Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. et Holzhütter H. G. (2000). « The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing », *ATLA* 28, pp. 371-401.
- (11) Balls M., Blauboer 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.

(12) 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 : [<http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>].

(13) 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 :

(14) CE-CEVMA. (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an In Vitro Test for Skin Corrosivity), Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC10), 3 avril 1998. Disponible à l'Adresse : [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].

(15) CE-CEVMA. (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC14), 21 mars 2000. Disponible à l'Adresse : [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].

(16) Hoffmann Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. et Fuchs H.W. (2005). « Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for In Vitro Skin Corrosivity Testing. » Toxicol. In Vitro 19, 925-929.

(17) Kandárová H. Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., et Rosdy M. (2006). « Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for In Vitro Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431 ». Toxicol. In Vitro 20, 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. et Fraissinette A.B. (2010). « Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample ». Toxicol. In Vitro 24, 1379-1385.

(19) CE-CEVMA. (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC25), (17 novembre 2006). Disponible à l'Adresse : [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].

(20) CE-CEVMA. (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an In-Vitro Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC30), (12 juin 2009). Disponible à l'Adresse : [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].

(21) OECD. (2013). Summary Document on the Statistical Performance Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health and Safety

Publications, Series on Testing and Assessment (No. 190.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28, 131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No. 431. *Toxicol. In Vitro* 29, 2055–2080.

(24) OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Corrosion in Relation to TG 431. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(25) OECD (2005) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. et al. (2012). « Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations ». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 393-403.

(27) Mosmann T. (1983). « Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays ». *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(28) Tinois E. et al. (1994). « The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis In Vitro ». In : *In Vitro Skin Toxicology*, dir. : Rougier A., Goldberg A.M. et Maibach H.I.: 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. et Klausner M. (1994). « New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing ». *Toxicol. In Vitro* 8, 889 - 891.

(30) Ponc M., et al. (2000). « Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models ». *Inter. J. Pharmaceu.* 203, 211 - 225.

(31) Tinois E., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J et Mommaas M. (1991). « In Vitro and Post –Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute ». *Exp. Cell Res.* 193: 310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS et Rosenberg M. (1992). « The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function ». *Cytotech.* 9, 163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). « Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications ». *Biotech. Bioeng.* 43/8, 747-756.

(34) EpiSkin™ SOP, Protocole INVITTOX n° 118. (décembre 2011). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test. Disponible à l'Adresse : [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].

(35) EpiDerm™ SOP, Version MK-24-007-0024. (février 2012). Protocole sur : In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's

Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm. Disponible à l'Adresse : [\[http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html\]](http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html).

(36) SkinEthic™ RHE SOP, Protocole INVITTOX. (janvier 2012). SkinEthic™ Skin Corrosivity Test. Disponible à l'Adresse : [\[http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html\]](http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html).

(37) EpiCS® SOP version 4.1. (janvier 2012). In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (EpiCS®) CellSystems. Disponible à l'Adresse : [\[http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html\]](http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html).

(38) 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., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscrit en Préparation.

(39) US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponible à l'Adresse : [\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

(40) Katoh M., Hamajima F., Ogasawara T., and Ken-ichiro Hata. (2010). Assessment of the human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin corrosion testing according to the OECD test Guideline 431. *J Toxicol. Sci.* 35, 411-417.

(41) LabCyte Validation Management Team (2018). Validation Study for in vitro skin corrosion test method using reconstructed human epidermal tissue LabCyte EPI-MODEL24. Available at: [\[http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z1.pdf\]](http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z1.pdf).

(42) LabCyte EPI-MODEL24 SCT SOP, Version 1.6. (May, 2017). Skin corrosion test using the reconstructed human model "LabCyte EPI-MODEL24". Available at: [\[http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z2.pdf\]](http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z2.pdf).

(43) Report of the Peer-review of the validation study for LabCyte EPI-MODEL24 In Vitro Skin Corrosion Test Method. Available at [\[http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z3.pdf\]](http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z3.pdf).

ANNEXE 1 - DÉFINITIONS

CI50 : valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI50) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE50.

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 substances mises à l'essai (25).

Contrôle positif : réplicat contenant tous les éléments du dispositif d'essai, traité au moyen d'une substance connue pour induire une réponse positive. Afin de s'assurer que la variabilité des réponses du contrôle positif peut être évaluée dans le temps, l'intensité de la réponse positive ne doit pas être excessive.

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'une substance d'essai 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'alopecie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

DO : densité optique

Dose infinie : quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Épreuve : consiste à tester une ou plusieurs substances d'essai parallèlement à un contrôle négatif et à un contrôle positif.

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 (25).

HPLC/UPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance / Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (en anglais : High Performance Liquid Chromatography/ Ultra High Performance Liquid Chromatography).

IATA : Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

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

MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényltétrazolium

MTT NS : Réduction non spécifique du MTT

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 (25).

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. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (25).

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 (25).

Produit chimique : substance ou mélange.

Produit chimique testé: ce qui est testé.

Réplique d'essai : méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Ce type d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (25).

Sensibilité : proportion de l'ensemble 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 catégoriels, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (25).

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).

Substance mono-constituant : une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80% (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'une 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.

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.

Témoin Tmort NS : témoin de couleur non-spécifique dans les tissus morts.

Témoin Tvivant NS : témoin de couleur non-spécifique dans les tissus vivants.

MTT NS : réduction non-spécifique du MTT

TE50 : valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI50.

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

Viabilité cellulaire : paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], 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 vivantes.

ANNEXE 2 - PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DES MÉTHODES D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ
VALIDÉES POUR LES ESSAIS DE CORROSION CUTANÉE

No.	1	2	3	4	5
Éléments de la méthode d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
Surface du modèle	0.38 cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.6 cm ²	0.3cm ²
Nombre de réplicats de tissus	Au moins 2 par temps d'exposition	2-3 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition
Nombre de réplicats de tissus	Au moins 2 par temps d'exposition	2-3 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition
Doses de traitement et application	<p><u>Liquides et matières visqueuses</u> : 50 µL ± 3 µL (131.6 µL/cm²)</p> <p><u>Solides</u> : 20 ± 2 mg (52.6 mg/cm²) + 100 µL ± 5µL de solution NaCl (9 g/L)</p> <p><u>Cires/matières collantes</u> : 50 ± 2 mg (131.6 mg/cm²)</p>	<p><u>Liquides</u> : 50 µL (79.4 µL/cm²) avec ou sans tulle de nylon</p> <p><i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i></p> <p><u>Semi-solides</u> : 50 µL (79.4 µL/cm²)</p>	<p><u>Liquides et matières visqueuses</u> : 40 µL ± 3 µL (80 µL/cm²) avec tulle de nylon</p> <p><i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i></p> <p><u>Solides</u> : 20 µL ± 2 µL de H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²)</p>	<p><u>Liquides</u> : 50 µL (83.3 µL/cm²) avec tulle de nylon</p> <p><i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i></p> <p><u>Semi-solides</u> : 50 µL (83.3 µL/cm²)</p>	<p><u>Liquides et matières visqueuses</u> : 50 µL (166.7 µL/cm²)</p> <p><u>Solides</u> : 50±2 mg (166.7mg/cm²) + 50 µL H₂O</p> <p><u>Cires et matières collantes</u> : utiliser une</p>

No.	1	2	3	4	5
	avec tulle de nylon	<p><u>Solides</u> : 25 µL de H₂O (ou plus si nécessaire) + 25 mg (39.7 mg/cm²)</p> <p><u>Cires</u> : disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µL de H₂O</p>	<p><u>Cires /matières collantes</u> : 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) avec tulle de nylon</p>	<p><u>Solides</u> : 25 mg (41.7 mg/cm²) + 25 µL de H₂O (ou plus si nécessaire)</p> <p><u>Cires</u> : disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µL de H₂O</p>	pipette à déplacement positif et une pointe comme substance liquide et visqueuse
)Pré-vérification de la réduction directe du MTT	<p>50 µL (liquides) ou 20 mg (solides) + 2 mL de MTT 0.3 mg/mL de solution pendant 180 ± 5 min à 37°C, sous CO₂ 5 %, HR 95 %</p> <p>→ si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau</p>	<p>50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 mL de MTT 1 mg/mL de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO₂ 5 %, HR 95 %</p> <p>→ si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur</p>	<p>40 µL (liquides) ou 20 mg (solides) + 1 mL de MTT 1 mg/mL de solution pendant 180± 15 min à 37°C, sous CO₂ 5 %, HR 95 %</p> <p>→ si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur</p>	<p>50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 mL de MTT 1 mg/mL de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO₂ 5%, HR 95 %</p> <p>→ si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur</p>	<p>50 µL (liquides) ou 50 mg (solides) + 500 µL de MTT à 0.5mg/mL pendant 60 min à 37°C 5% CO , 95% RH</p> <p>→ si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur</p>

No.	1	2	3	4	5
		tissus tués par congélation	tissus tués par congélation	tissus tués par congélation	tissus tués par congélation
Pré- vérification des interférences de couleur	10 µL (liquides) ou 10 mg (solides) + 90 µL de H ₂ O mélangés pendant 15 min à TA → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µL de H ₂ O pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	40 µL (liquides) ou 20 mg (solides) + 300 µL de H ₂ O mélangés pendant 60 min à TA → si la substance d'essai se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µL de H ₂ O pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	50 µL (liquides) ou 50 mg (solides) + 500 µL de H ₂ O mélangée pendant 60 min à 37°C sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants
Temps d'exposition et température	3 min, 60 min (± 5 min) et 240 min (± 10 min) en armoire ventilée à température ambiante (TA, 18-28°C)	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %

No.	1	2	3	4	5
Rinçage	25 mL 1x SSTP (2 mL/nettoyage)	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	10 fois ou plus à jet doux constant de 1x SSTP
Contrôle négatif	50 µL de solution NaCl (9 g/L) Testé pour chaque temps d'exposition	50 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	40 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	50 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	50 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition
Contrôle positif	50 µL d'acide acétique glacial Testé pendant 4 heures seulement	50 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition	40 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pendant 1 heure seulement	50 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition	50 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour 1 heure seulement
Solution MTT	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0.5 mg/mL
Durée et température d'incubation du MTT	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %
Solvant d'extraction	500 µL d'isopropanol acidifié (0.04 de N HCl dans de l'isopropanol)	2 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1.5 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le	2 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le	300 µL isopropanol (tissu isolé entièrement immergé)

No.	1	2	3	4	5
	(tissu isolé entièrement immergé)		dessous de l'insert)	dessous de l'insert)	
Durée et température d'extraction	Pendant une nuit à TA, à l'abri de la lumière	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 pm) à TA	Pendant une nuit à TA, à l'abri de la lumière
Lecture de la DO	570 nm (545-595 nm) sans filtre de référence	570 nm (ou 540 nm) sans filtre de référence	570 nm (540- 600 nm) sans filtre de référence	540-570 nm sans filtre de référence	570 nm avec filter de reference 650 nm
Contrôle de qualité des tissus	18 heures de traitement par SDS 1.0 mg/mL ≤ CI ₅₀ ≤ 3.0 mg/mL	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4.08 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 8.7 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4.0 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 10.0 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 2.0 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 7.0 heures	18 heures de traitement par SDS 1.4 mg/mL ≤ CI ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (NaCl) doit être ≥ 0.6 et ≤ 1.5 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.8 et ≤ 2.8 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.8 et ≤ 3.0 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.8 et ≤ 2.8 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.7 et ≤ 2.5 pour chaque temps d'exposition

No.	1	2	3	4	5
	<p>exposés pendant 4 heures au témoin positif (acide acétique glacial), exprimée en % du témoin négatif, doit être $\leq 20\%$</p> <p>3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les $DO \geq 0.3$, la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %</p>	<p>exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être $< 15\%$</p> <p>3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 %, le coefficient de variation (CV) entre les réplicats de tissus doit être $\leq 30\%$</p>	<p>réplicats de tissus exposés pendant 1 heure (et 4 heures le cas échéant) au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être $< 15\%$</p> <p>3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les $DO \geq 0.3$, la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %</p>	<p>réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être $< 20\%$</p> <p>3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les $DO \geq 0.3$, le différence de viabilité entre les deux réplicats ne doit pas dépasser 30%.</p>	<p>2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être $< 15\%$</p> <p>1. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les $DO \geq 0.3$, le différence de viabilité entre les deux réplicats ne doit pas dépasser 30%.</p>

ANNEXE 3 - PERFORMANCE DES MÉTHODES D'ESSAI EN MATIÈRE DE SOUS-CATÉGORISATION

Le tableau ci-dessous illustre les performances des cinq méthodes d'essai, déterminées à partir d'un ensemble de 79 ou 80 produits chimiques testés par les cinq développeurs. Les calculs pour quatre des méthodes (EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS®) ont été réalisés par le Secrétariat de l'OCDE, puis revus et approuvés par un sous-groupe d'experts (21) (23). Les calculs pour le LabCyte EPI-MODEL24 ont été effectués par le développeur, revus et agréés par un panel d'examen par les pairs (41) (43).

STATISTIQUES SUR LES PRÉDICTIONS OBTENUES SUR L'ENSEMBLE COMPLET DE PRODUITS CHIMIQUES

(n = 80 produits chimiques, testés lors de 2 épreuves indépendantes pour epiCS® ou 3 épreuves indépendantes pour EpiDerm™, EpiSkin™, SkinEthic™ RHE, respectivement, soit 159* ou 240 classifications)

n= 79** chemicals tested over 3 independent runs for LabCyte EPI-MODEL24 SCT, i.e. 237 classification.)

* un produit chimique n'a pu être testé qu'une seule fois sur epiCS® car indisponible (23).

** un produit chimique n'a pu être testé qu'une seule fois sur in LabCyte EPI-MODEL24 SCT car indisponible.

	EpiSkin	EpiDerm	SkinEthic	epiCS	LabCyte EPI-MODEL24
Surclassifications :					
Substances de cat. 1BC surclassées en 1A	21.5%	29.0%	31.2%	32.8%	30.0%
Substances non corrosives surclassées en 1BC	20.7%	23.4%	27.0%	28.4%	18.9%
Substances non corrosives surclassées en 1A	0.0%	2.7%	0.0%	0.0%	2.7%
Substances non corrosives surclassées comme corrosives	20.7%	26.1%	27.0%	28.4%	21.6%
Taux global de surclassification (toutes catégories)	17.9%	23.3%	24.5%	25.8%	21.5%
Sous-classifications :					
Substances de cat. 1A sous-classées en 1BC	16.7%	16.7%	16.7%	12.5%	13.9%
Substances de cat. 1A sous-classées comme non corrosives	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Substances de cat. 1BC sous-classées comme non corrosives	2.2%	0.0%	7.5%	6.6%	0.0%
Taux global de sous-classification (toutes catégories)	3.3%	2.5%	5.4%	4.4%	2.1%
Classifications correctes :					
Correctement classées en 1A	83.3%	83.3%	83.3%	87.5%	86.1%

Correctement classées en IBC	76.3%	71.0%	61.3%	60.7%	70.0%
Correctement classées comme non corrosives	79.3%	73.9%	73.0%	71.62%	78.4%
Précision (Valeur prédictive)	78.8%	74.2%	70.0%	69.8%	76.4%

ANNEXE 4 - Paramètres fondamentaux et critères d'acceptabilité pour la qualification d'un système de spectrophotométrie HPLC/UPL pour quantifier le formazan des extraits tissulaires.

Paramètre	Protocole dérivé d'un document d'orientation de la <i>Food and Drug Administration</i> (37) (38)	Critère d'acceptabilité
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, blanc vivant (isopropanol extrait de tissu vivant non traité), blanc mort (isopropanol extrait de tissu mort non traité)	$\frac{\text{Surface}_{\text{interférence}}}{\text{surface}_{\text{LBQ}}} \leq 20\%$
Précision	Contrôles de qualité (càd. Formazan à 1.6 µg /mL, 16 µg /mL et 160 µg /mL) dans l'isopropanol (n=5)	$\text{CV} \leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la LBQ
Exactitude	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Dev $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la LBQ
Effet matriciel	Contrôles de qualité dans le blanc vivant	$85\% \leq \text{Effet matriciel} \% \leq 115\%$
Report	Analyse de l'isopropanol après un standard de LHQ	$\frac{\text{Surface}_{\text{interférence}}}{\text{surface}_{\text{LBQ}}} \leq 20\%$
Reproductibilité (dans la journée)	3 courbes indépendantes de calibration (sur la base de dilutions consécutives à 1/3 de formazan dans l'isopropanol, en partant de la LBQ, càd. 200 µg /mL); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Etalonnage Courbes: %Dev $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour LBQ Qualité Témoins: %Dev $\leq 15\%$ et $\text{CV} \leq 15\%$
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysés le jour de la préparation et après 24h de stockage à température ambiante.	% Dev $\leq 15\%$
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysés le jour de la préparation et plusieurs jours de stockage à des températures spécifiques (p.ex. 4.	% Dev $\leq 15\%$

LBQ: Limite Basse de Quantification, définie par une couverture de 1-2% de viabilité tissulaire, c'est-à-dire 0.8 µg/mL.

LHQ: Limite Haute de Quantification, définie pour être au moins deux fois supérieure à la détection maximale attendue de concentration de formazan dans les extraits d'isopropanol des témoins négatifs, c'est-à-dire 200 µg/mL.