



Section 4
Effets sur la santé

Essai n° 439
Irritation cutanée *in vitro*: essai sur
épiderme humain reconstitué

25 juin 2025

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



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

IRRITATION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTRUITE

INTRODUCTION

1. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions après exposition à une substance ou un mélange [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU)] (1) (2). La présente Ligne directrice (LD) propose une procédure in vitro pouvant servir à identifier les dangers liés aux produits chimiques (substances et mélanges) irritants, classés en catégorie 2, correspondant à la définition du SGH de l'ONU (1) (2) (3). Pour les pays membres ou régions n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative (substances faiblement irritantes) selon le SGH de l'ONU, la présente Ligne directrice peut aussi servir à identifier des produits chimiques non classés. Par conséquent, suivant le cadre réglementaire et le système de classification en vigueur, cette Ligne directrice peut être utilisée pour déterminer le pouvoir irritant pour la peau d'un produit chimique, en tant que méthode de substitution à part entière remplaçant l'essai d'irritation cutanée in vivo, ou en tant que méthode substitutive partielle, dans le cadre d'une stratégie d'essai (3).
2. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [LD 404 de l'OCDE, adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015] (4). Pour tester le potentiel de corrosivité, trois méthodes d'essai in vitro validées ont été adoptées: elles constituent respectivement les Lignes directrices de l'OCDE 430, 431 et 435 (5) (6) (7). Le Document Guide No. 203 de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation (IATA) pour l'irritation et la Corrosion de la peau décrit plusieurs modules qui rassemblent les sources d'information et les outils d'analyse et (i) fournit des orientations sur la façon d'intégrer et d'utiliser les données d'essais et autres données pour l'évaluation du potentiel d'irritation ou de corrosion de la peau des produits chimiques testés et (ii) propose une approche quand des essais supplémentaires sont requis (3).
3. La présente Ligne directrice porte sur le danger d'irritation cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un système d'essai in vitro utilisant un épiderme humain reconstitué qui reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. Le système d'épiderme humain reconstitué utilise des dérivés de kératinocytes humains non transformés comme source cellulaire afin de reconstruire un modèle d'épiderme comprenant une cyto-architecture et une histologie représentatives. Un ensemble de normes de performance ont été développées afin de faciliter la validation et l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées, conformément aux principes du document d'orientation n°34 (8) (9). La présente Ligne directrice a été initialement adoptée

en 2010, puis mise à jour une première fois en 2013 afin d'y inclure de nouvelles méthodes d'essai faisant usage du modèle de peau humaine reconstituée, puis une seconde fois en 2015 afin d'y inclure la référence au Document guide IATA No. 203 et d'y introduire une procédure alternative de mesure de la viabilité cellulaire et mis à jour plus récemment pour y inclure d'autres méthodes utilisant le modèle de l'épiderme humain reconstruit. La dernière mise à jour a été effectuée en 2025 pour soustraire le modèle EpiSkin™ qui n'est plus commercialement disponible. Les éléments de cette méthode avaient été utilisés pour définir les éléments essentiels de ces méthodes d'essais dans le document sur les Standards de Performance (24). Par ailleurs, les données de cette méthode permettant l'identification des substances classées par rapport aux substances non classées forment la base principale pour le calcul de la spécificité et de la sensibilité des standards de performance définis à l'origine.

4. Les méthodes d'essai sont comprises dans la présente Ligne directrice sont listées dans l'annexe 2 qui fournit également des informations sur le type d'étude de validation menée pour valider chaque méthode respectivement. Comme noté dans l'annexe 2, la méthode de référence validée (MRV) a été utilisée pour développer la présente Ligne directrice, y compris les normes de performance (8). A la suite d'une revue indépendante, toutes les méthodes comprises dans cette Ligne directrice ont la capacité prédictive minimum suivante : 80% de sensibilité, 70% de spécificité, et 75 % d'exactitude. L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie pour les méthodes d'essai qui sont validées selon les normes de performance (8) seulement si ces méthodes d'essai ont été examinées et adoptées par l'OCDE. Les méthodes d'essai figurant dans la présente Ligne directrice peuvent être utilisées sans discrimination dans le but de répondre aux exigences réglementaires des pays et de générer des résultats d'essai issus de l'une des méthodes d'essai in vitro sur l'irritation de la peau, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données. Les Standards de Performance existants (24) restent valables après la soustraction du modèle EpiSkin™.

5. Les définitions des termes utilisés dans ce document figurent à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

6. L'une des limites de la présente Ligne directrice, comme l'a démontré l'étude de validation prospective complète évaluant et caractérisant les méthodes d'essai sur l'épiderme humain reconstitué (16), est qu'elle ne permet pas la classification des produits chimiques dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (1). Par conséquent, son utilisation sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres. Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux faisant suite à une exposition unique, le Document Guide no. 203 sur les Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation doit être consulté (3). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

7. La présente Ligne directrice se rapporte aux effets irritation de la peau humaine. Si elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée, on notera cependant que la LD 431 de l'OCDE relative à la corrosion cutanée, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (6). La présente Ligne directrice a recours à des modèles d'épiderme humain reconstitué utilisant des kératinocytes humains, et reproduisant donc in vitro l'organe cible de l'espèce étudiée ; de plus, elle couvre directement l'étape initiale de la cascade inflammatoire/du mécanisme d'action (lésions cellulaires et tissulaires causant un traumatisme localisé) survenant au cours de l'irritation in vivo. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation de MRV sous-tendant cette Ligne directrice ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données de cette étude totalisait 58 produits chimiques (16) (18) (23). La présente Ligne directrice peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des semi-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 prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation (29). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir 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.

8. Lors de l'examen des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester (p. ex. instables) ou des produits chimiques d'essai qui ne sont pas clairement dans le domaine d'applicabilité décrits dans la présente directive, il convient de tenir compte de la question de savoir si les résultats de ces essais des résultats scientifiquement significatifs. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Cependant, du fait que les mélanges couvrent une large gamme de catégories et de composition, et que l'information sur les essais de mélanges est encore parcellaire, il convient de ne pas utiliser la présente Ligne directrice pour une catégories spécifique de mélanges quand il a été démontré que la Ligne directrice ne s'applique pas à cette catégorie spécifique (par exemple en suivant la stratégie proposée par Eskes *et al.* (30)). Des précautions similaires doivent être prises dans les cas où des classes ou des propriétés physico-chimiques spécifiques limitent l'utilisation de la Ligne directrice. Une étude comparant les données *in vitro* et *in vivo* pour 65 formulations agrochimiques a révélé une précision globale de 54% (basée sur 65 formulations agrochimiques), une sensibilité de 44% (basée sur 25 formulations) et une spécificité de 60% (basée sur les formulations 40). Ces données indiquent un manque d'applicabilité du test d'irritation cutanée *in vitro* basé sur la RhE pour les formulations agrochimiques (47).

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 requièrent l'utilisation de témoins adaptés pour la correction (voir paragraphes 27 à 33).

10. Une seule expérience réalisée à l'aide de trois réplicats de tissus identiques devrait suffire pour tester les produits chimiques dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou une viabilité moyenne égale à $50 \pm 5 \%$, une seconde expérience est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Le produit chimique 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, similaires à celles que l'on observe *in vivo*.

12. L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste principalement par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du produit chimique à travers le stratum corneum où il peut causer la lésion des couches sous-jacentes de kératinocytes et les autres cellules de la peau. En mourant, les cellules lésées peuvent soit rejeter des médiateurs de l'inflammation ou induire la cascade inflammatoire qui agit aussi sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales des vaisseaux sanguins. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des

érythèmes et des œdèmes observés (29). Il faut noter que les méthodes d'essai fondées sur l'utilisation d'épiderme humain reconstitué permettent de mesurer les événements déclencheurs de la cascade, p.ex. les lésions cellulaires et tissulaires (16) (17), en l'absence de toute vascularisation du système d'essai in vitro, grâce à la lecture de la viabilité cellulaire.

13. La viabilité cellulaire du modèle d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (31). Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé ($\leq 50\%$, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU). En fonction du cadre législatif et de l'applicabilité de la présente Ligne directrice, les produits chimiques testés produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants ($> 50\%$, sans catégorie).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

14. Avant d'appliquer en routine l'une des méthodes d'essai validées conformes à la présente Ligne directrice (annexe 2), les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en utilisant les 10 substances énumérés au tableau 1. Les utilisateurs des méthodes comprises dans la Ligne directrice peuvent consulter le Tableau 2 de l'annexe 3 pour les valeurs indicatives de viabilité cellulaire atteintes pour chacune des substances d'épreuve de compétences énumérées dans le Tableau 1 ci-dessous. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 1 serait indisponible ou ne peut pas être utilisé pour des raisons justifiées, 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 (8)), 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. L'utilisation d'une substance d'épreuve de compétence autre que celles énumérées au tableau 1 doit être justifiée.

15. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé aux utilisateurs de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'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 acquis et démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification.

Table 1. Substances utilisés pour les épreuves de compétence¹

Substancee	Numéro CAS	Score <i>in vivo</i> ²	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU
SUBSTANCES NON CLASSÉES (Sans catégorie dans le SGH de l'ONU)				
acide naphtylacétique	86-87-3	0	solide	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	0.3	liquide	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	1	solide	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	1.7	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ³
salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ³
SUBSTANCES CLASSÉES (Catégorie 2 du SGH de l'ONU)				
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2.3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane ⁴	111-25-1	2.7	liquide	catégorie 2
hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 5 %)	1310-58-3	3	liquide	catégorie 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine ⁴	5271-27-2	3.3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3.4	liquide	catégorie 2

Note:

¹ Ces produits chimiques constituent un sous-ensemble des produits chimiques utilisés dans l'étude de validation et leur sélection repose sur les critères suivants : (i) les substances chimiques sont disponibles dans le commerce, (ii) ils sont représentatifs de la gamme de scores d'irritation obtenus avec le test de Draize (de non-irritant à fortement irritant), (iii) ils ont une structure chimique bien définie, (iv) ils sont représentatifs des fonctions chimiques utilisées dans le processus de validation, (v) ils ont donné des résultats in vitro au cours des nombreux essais dans de nombreux laboratoires, (vi) ils ont fourni des prédictions in vitro correctes, et (vii) ils ne sont pas associés à un profil extrêmement toxique (par exemple cancérigène ou toxiques pour la reproduction) et ils ne sont pas associés à des coûts de recyclage prohibitifs.

² Score in vivo d'après la Ligne directrice de l'OCDE n° 404 (4).

³ Dans cette Ligne directrice, les substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (matières faiblement irritantes) (1) sont considérées comme « sans catégorie ».

⁴ le 1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine et le 1-bromohexane peuvent avoir des résultats variables dans différents laboratoires dépendant du fournisseur et peuvent être considérés comme suggéré au paragraphe 15.

PROTOCOLE

16. Les éléments et le protocole d'une méthode d'essai d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après (voir aussi l'annexe 3 concernant les paramètres liés à chaque méthode d'essai). Il existe des modes opératoires normalisés pour les méthodes d'essai contenues dans la présente Ligne directrice (32) (33) (34) (35) (42) (44) (48). En dépit du fait que le modèle EpiSkin™ n'est plus disponible dans le

commerce, les références documentaires sont laissées dans la Ligne directrice à des fins d'évaluation des données, et non pas pour générer de nouvelles données.

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

Conditions générales

17. L'épiderme 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 de substances cytotoxiques de référence telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière est démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance de référence 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 de référence à une concentration fixe déterminée. Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente 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 est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

18. L'essai utilisé pour quantifier la viabilité est l'essai MTT (31). Les cellules viables de l'épiderme humain reconstruit peuvent réduire le colorant vital MTT en un précipité bleu de MTT formazan qui est alors extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou un solvant similaire). La densité optique du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieur à 0.1. Le MTT formazan extrait peut être quantifié soit par la mesure de l'absorbance standard (DO) ou par une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (36), comme décrit au paragraphe 33. Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai d'irritation cutanée) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les six méthodes validées comprises dans cette Ligne directrice sont indiquées dans le tableau 4 de l'annexe 3. L'utilisateur de spectrophotométrie HPLC-UPLC utilisera la gamme de DO du témoin négatif fournie au tableau 4 de l'annexe 3 comme critère pour le contrôle négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition.

Fonction de barrière

19. Le stratum corneum et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques de référence telles que le SDS ou le Triton X-100. Cette capacité est évaluée par la CI50 et le TE50 (tableau 5 de l'annexe 3).

Morphologie

20. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un stratum corneum multicouche).

Reproductibilité

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

Contrôle de qualité

22. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué garantisse et démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 18), à la fonction de barrière (paragraphe 19) et à la morphologie (paragraphe 20). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI50 ou TE50 est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain. Seuls les résultats obtenus à l'aide de tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants des produits chimiques testés. Les plages d'acceptabilité pour les méthodes comprises dans la présente Ligne directrice sont indiquées dans le tableau 5 de l'annexe 3.

Application des produits chimiques testés et des substances témoins

23. Il convient d'utiliser au minimum trois réplicats par essai pour chaque produit chimique testé et pour les témoins. 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, c'est à dire dans une gamme de 26 à 83 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ou mg/cm^2 (voir l'annexe 3). Dans le cas de produits chimiques solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact entre la substance d'essai et la surface de l'épiderme. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Un filet en nylon peut être utilisé pour aider l'étalement de la poudre en couche fine pour toutes les conditions du test (voir annexe 3). À la fin de la période d'exposition, la surface de l'épiderme est nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0.9 %, afin d'éliminer le produit chimique testé. En fonction de la méthode sur épiderme humain reconstitué utilisée, la période d'exposition peut s'étendre de entre 15 à 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37°C. Les durées et températures d'exposition sont optimisées pour chacune des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué, et tiennent compte des propriétés intrinsèques de chaque méthode (p. ex. la fonction de barrière).

24. Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) sont utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (dans le cas du TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. Pour les TN, il est recommandé d'utiliser de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline (PBS)].

Mesures de la viabilité cellulaire

25. Selon le protocole, il est essentiel que mesures de la viabilité ne soient pas réalisées immédiatement après l'exposition au produit chimique testé, mais après une période d'incubation post-traitement suffisamment longue du tissu rincé dans un milieu frais. Cette période permet aussi bien la disparition des effets faiblement cytotoxiques que l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Une période d'incubation post-traitement de 42 heures s'est révélée optimale au cours de l'optimisation de deux des méthodes basées sur l'épiderme humain reconstitué sous-tendant cette Ligne directrice (11)(12)(13)(14)(15), et constitue dorénavant un paramètre standard pour les méthodes incluses dans la présente Ligne directrice.

26. Le test du MTT est une méthode quantitative standardisée, recommandée pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette Ligne directrice. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple, 0.3-1 mg/mL) pendant 3 heures. Le MTT est converti en bleu de formazan par les cellules viables. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (ex. : 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 en utilisant une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (voir paragraph 33) (36).

27. Les propriétés optiques du produit chimique testé ou son action chimique sur le MTT (p. ex. les produits chimiques peuvent aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer) sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité. Cela peut se produire lorsque le produit chimique testé n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme. Si un produit chimique agit directement sur le MTT (p. ex. un agent réducteur du MTT), est naturellement coloré, ou s'il se colore durant le traitement du tissu, des contrôles supplémentaires sont pratiqués pour détecter et corriger les interférences du produit chimique avec la mesure de la viabilité (voir paragraphes 28 et 32). 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 validées contenues dans cette Ligne directrice (32) (33) (34) (35)(42)(44)(48).

28. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique testé à un milieu MTT fraîchement préparé. 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'épiderme 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 procédure d'essai complète pour générer un témoin de réduction non spécifique du MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35)(42)(44)(48). Un seul témoin MTT NS par produit chimique testé suffit, indépendamment du nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du 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].

29. 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 32 et 33). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique testé causant une interférence est appliquée sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution 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].

30. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une réduction directe du MTT (voir paragraphe 28) et une interférence de couleurs (voir paragraphe 29), 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 28. Cela rend la réalisation des témoins MTT NS et Tvivants NS obligatoires par principe. Les produits chimiques testés nécessitant la réalisation des deux témoins NSMTT et CNSvivants sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin NSMTT 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] - [%NSMTT] - [%Tvivants NS] + [%Tmorts NS].

31. 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 (lors des mesures de densité optique), et qu'une réduction non spécifique du MTT peut aussi élargir la surface de pic de formazan de l'extrait tissulaire au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par HLCP/UPLC-spectrophotométrie). 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 auprès de l'entreprise Sigma-Aldrich (Cat# M2003), 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 est $\leq 50\%$. 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 car ce seuil représente la limite utilisée pour différencier les produits chimiques classés des non-classés (voir paragraphe 35).

32. 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 33) (36). Le système HPLC/UPLC permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (36). 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 28). Lorsqu'une procédure par CLHP/CLUP-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 : %viabilitétest 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.

33. 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) (36). 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 (36)(37). 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

34. Pour chaque méthode d'essai faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 22), les tissus traités par le témoin négatif (TN) présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception ainsi qu'à l'intégralité du protocole. Les valeurs de DO des témoins ne sont pas inférieures aux limites historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, rendent compte de leur capacité à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (voir annexe 3 et pour plus d'information les modes opératoires standardisés des méthodes d'essai contenues dans cette Ligne directrice (32)(33)(34)(35)(42)(44)(48). Les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les réplicats de tissu (c'est-à-dire les écarts-types doivent normalement se situer dans les limites d'acceptation établies pour la méthode d'essai considérée (voir annexe 3)).

Interprétation des résultats et modèle prédictif

35. La valeur de DO obtenue pour chaque produit chimique testé peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. En cas d'utilisation de la procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC, la viabilité cellulaire calculée est le pourcentage de pic de MTT formazan obtenu avec les tissus vivants traités par le produit chimique testé par rapport au pic de MTT formazan obtenu avec le témoin négatif testé simultanément. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les produits chimiques irritants et les produits chimiques non classés, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les produits chimiques irritants, sont clairement définies et étayées par des données. Il conviendra par ailleurs de démontrer leur pertinence (voir les modes opératoires standardisés pour information). Les valeurs seuils permettant de prédire les effets irritants sont indiquées ci-dessous :

- Le produit chimique testé est identifié nécessitant classification et étiquetage selon le SGH de l'ONU (catégorie 1 ou catégorie 2) si le pourcentage moyen de viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieure ou égale ($\leq$) à 50 %. Puisque les méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué comprises dans cette Ligne directrice ne sont pas en mesure de différencier les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU, de plus amples informations sur le potentiel de corrosion de la peau seront requises pour décider sur la classification finale [voir aussi le Document Guide IATA No. 203(3)]. Dans le cas où le produit chimique testé est identifié comme non-corrosif (par exemple sur la base de la LD 430, 431 ou 435), et montre une viabilité cellulaire après traitement, et que l'incubation post-traitement est inférieure ou égale à 50%, le produit chimique testé est considéré comme irritant pour la peau, conformément avec la Catégorie 2 du SGH de l'ONU.
- Selon la réglementation des pays membres (p.ex en cas de non-adoption de la catégorie 3 optionnelle du SGH de l'ONU), le produit chimique peut-être considéré comme non irritant pour la peau conformément à l'absence de catégorie du SGH de l'ONU si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est supérieure ($>$) à 50 %.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

36. 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 reproduisant les expériences. Il conviendra en outre de préciser les valeurs moyennes $\pm$ écart-type correspondant à chaque essai. Les interactions observées avec le réactif MTT et les produits chimiques d'essai colorés seront signalées pour chaque produit chimique testé.

Rapport d'essai

37. 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), y compris les données spectrales pour les UVCB si possible, 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 (T_{vivant} NS), témoin mort non spécifique (T_{mort} 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

- Toute déviation de la Ligne directrice identifiée pendant la conduite de l'essai, et l'impact ou non sur les résultats de l'essai.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) 1. United Nations (UN). (2023). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 10th Revised Edition, UN New York and Geneva, 2023. Available at: [<https://unece.org/ghs-rev10-2023>].
- 2) EURL-ECVAM. (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three In Vitro Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC30), 9 avril 2009. Disponible à l'Adresse : [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
- 3) OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 203.) .Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) OCDE. (2015). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (No. 404.) : Effet Irritant/Corrosif Aigu sur la Peau. Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris.
- 5) OCDE. (2015). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (No. 430.) : Corrosion Cutanée In Vitro : Essai de Résistance Electrique Transcutanée (TER). Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris.
- 6) OCDE. (2016). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (No. 431.) : Corrosion Cutanée In Vitro : Essai sur Modèle de Peau Humaine. Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris.
- 7) OCDE. (2015). Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Ligne Directrice pour les Essais de Produits Chimiques (No. 435.) : Méthode d'Essai In Vitro sur Membrane d'Etanchéité pour la Corrosion Cutanée. Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris
- 8) OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 220). Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris.
- 9) OCDE. (2005). « Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment », Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Série sur les Essais et les Evaluations (No. 34). [http://www2.oecd.org/oecdinfo/info.aspx?app=OLIScoteEN&Ref=ENV/JM/MONO\(2005\)14](http://www2.oecd.org/oecdinfo/info.aspx?app=OLIScoteEN&Ref=ENV/JM/MONO(2005)14) Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris.
- 10) Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. et Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation. Results and Evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.
- 11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. et Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.
- 12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. et Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests, ALTEX 21, 107–114.

- 13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. et Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, ATLA 33, 351-367.
- 14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. et Rubinstein, G. (2005). The In Vitro Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, ATLA 33, 329-349.
- 15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. et Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM Prevalidation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
- 16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, ATLA 35, 559-601.
- 17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . Disponible à l'Adresse: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
- 18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, ATLA 35, 603-619.
- 19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. et Leclaire, J. (2007). In Vitro Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, AATEX, 14, 351-358.
- 20) EURL-ECVAM. (2007). Statement on the Validity of In-Vitro Tests for Skin Irritation, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC26), (27 avril 2007). Disponible à l'Adresse: [[Error! Hyperlink reference not valid.http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html](http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html)].
- 21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing, Voir la Rubrique "Validation Study Documents, Section Skin Irritation", à l'Adresse : [[Error! Hyperlink reference not valid.http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html](http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html)].
- 22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of In vitro Tests for Skin Irritation Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC29), (5 novembre 2008). Disponible à l'Adresse : [[Error! Hyperlink reference not valid.http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html](http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html)].
- 23) OCDE. (2010). Document Explicatif Accompagnant le Projet de Ligne Directrice de l'OCDE sur l'Essai d'Irritation Cutanée In Vitro. Publications d'Environnement, Santé et Sécurité Série de l'OCDE sur les Essais et les Evaluations (No. 137.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for In Vitro Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, J Toxicol Sci, 34, 327-334.
- 25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD test guideline 439, AATEX, 16, 111-122.

- 26) OECD. (2011). Validation report for the skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 159.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 27) OECD. (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24, Environment Health and Safety Publications, OECD Series on Testing and Assessment (No. 155.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the In Vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- 29) Welss, T., Basketter, D. A. et Schröder, K. R. (2004). In Vitro Skin Irritation: Fact and Future, State of the Art Review of Mechanisms and Models. *Toxicol. in Vitro* 18, 231-243.
- 30) 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).
- 31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 32) EpiSkin™ SOP, Version 1.8. (February 2009). ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Disponible à l'Adresse : [Error! Hyperlink reference not valid.http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
- 33) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT). For use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200). Disponible à l'Adresse suivante: [Error! Hyperlink reference not valid.http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
- 34) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0. (February 2009). SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-incubation. Disponible à l'Adresse : [Error! Hyperlink reference not valid.http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html]
- 35) LabCyte EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3 (June 2011), Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24" .
[<http://www.jpte.co.jp/english/business/LabCyte/Testprotocol.pdf>].
- 36) 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. (2015) 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. *Toxicol In vitro*. 29(4), 741-761
- 37) 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>].
- 38) Harvell, J. D., Lamminstausta, K., et Maibach, H. I. (1995). Irritant Contact Dermatitis. In: *Practical Contact Dermatitis*, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.), Mc Graw-Hill, New York.
- 39) EURL-ECVAM. (2009). Performance Standards for In Vitro Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RHE). Disponible à l'Adresse : [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].

- 40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In Vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009. Disponible à l'Adresse: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
- 41) UE. (2001). Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 Portant Vingt-huitième Adaptation au Progrès Technique de la Directive 67/548/CEE du Conseil Concernant le Rapprochement des Dispositions Législatives, Réglementaires et Administratives Relatives à la Classification, l'Emballage et l'Etiquetage des Substances Dangereuses, Journal officiel des Communautés européennes L225, 1-333.
- 42) Skin+® RHE SOP, Version 5.0 (May 2016), Skin Irritation Test for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals with Sterlab's RHE: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at [http://www.sterlab-store.com/wp-content/uploads/SOP_Sterlab_skin_irritation_v5-May-2016.pdf].
- 43) Peer Review Report of the Validation of the Skin Irritation Tests Using Skin+® and Using epiCS® (2018)
- 44) epiCS® RHE SOP, Version 5.1 (January 2017) Skin Irritation Test for use with CellSystems Reconstructed Human Epidermal Model epiCS® Test Method 20 min application + 42 hours Post- Incubation. Available at [<https://reconstructed-human-epidermis.com/user-data/downloads/manuels-sops/INVITTOX%20protocol%20epiCS%20Skin%20Irritation%20version%205.1%2C%2001.2017.pdf>].
- 45) ESAC Opinion on the Validation Study of the epiCS® Test Method based on the EURL ECVAM/OECD Performance Standards for *in vitro* Skin Irritation Testing using Reconstructed human Epidermis (RhE), ESAC Opinion Number 2016-05
- 46) EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2016)
- 47) Kolle S.N, van Ravenzwaay B. and Landsiedel R. (2017). Regulatory accepted but out of domain: *In vitro* skin irritation tests for agrochemical formulations. Regul. Toxicol. Pharmacol 89, 125-130.
48. KeraSkin™ SIT SOP, Version 1.5 (January, 2019), KeraSkin™ skin irritation test operation protocol. Available at: [<http://www.keraskin.co.kr/eng/product/skinmodel.asp>]
49. Jung, K.M., Lee, S.H., Jang, W.H., Jung, H.S., Heo, Y., Park, Y.H., Bae, S., Lim, K.M., Seok, S.H., 2014. KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 28, 742-750.
50. Han, J., Kim, S., Lee, S.H., Kim, J.S., Chang, Y.J., Jeong, T.C., Kang, M.J., Kim, T.S., Yoon, H.S., Lee, G.Y., Bae, S., Lim, K.M., 2020. Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin for OECD test guideline 439. Regulatory toxicology and pharmacology : 117, 104725.
51. Reports of the Validation study and Validation Peer-Review for in vitro skin irritation test with 3D-reconstructed human epidermis model, KeraSkin™.

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 relatifs à des catégories. 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 à l'essai (9).

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.

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

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 (9).

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.

Irritation cutanée : apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'un produit chimique testé pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale du tissu cutané affecté qui se manifeste peu après une stimulation (38). Elle est provoquée par une réaction inflammatoire locale impliquant le système immunitaire inné (non spécifique) du tissu cutané. Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

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

MTT NS : réduction non-spécifique du MTT.

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 précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (9).

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (9).

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 (9).

Produit chimique : désigne une substance ou un mélange.

Sensibilité : proportion des produits chimiques testés positifs/actifs qui sont correctement classés par l'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 (9).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)] : 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 testés négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'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 (9).

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

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'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.

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

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

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.

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.

Expérience : une expérience consiste en un ou plusieurs produits chimique testé(s) simultanément avec un témoin négatif et un témoin positif, à l'aide de trois réplicats de tissus identiques.

ANNEXE 2 - MÉTHODES D'ESSAI FIGURANT DANS CETTE LD

Les études de pré-validation, d'optimisation et de validation ont été effectuées pour sept méthodes disponibles dans le commerce (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (43) (45) (50) (51), sur la base du système d'essai d'épiderme humain reconstruit ayant la capacité prédictive suivante : 80% de sensibilité, 70% de spécificité, 75% d'exactitude. Six de ces méthodes in vitro sont commercialement disponibles, seul le modèle EpiSkin™ n'est plus disponible dans le commerce. Les données générées par le modèle EpiSkin™ restent néanmoins couvertes par l'Acceptation Mutuelle des Données.

Ces sept méthodes d'essai sont comprises dans cette Ligne directrice and énumérées ci-dessous, à côté du type d'étude de validation effectué pour chacune des méthodes. Les méthodes EpiSkin™ et EpiDerm™ SIT (EPI-2000) ont été utilisées pour développer la présente Ligne directrice et les standards de performance (8) sont EpiSkin™ et EpiDerm™ SIT (EPI-200). Ces Standards de Performance (8) restent valables après la soustraction du modèle EpiSkin™.

N°	Nom de la méthode d'essai	Type d'étude de validation	Références
1	EpiSkin™ (VRM) (non disponible dans le commerce à partir de décembre 2024)	Étude de validation prospective complète (2003-2007). Les éléments de cette méthode d'essai ont servi à définir les éléments essentiels des normes de performance du CEVMA originales et actualisées* (39) (40) (21)*. De plus, c'est principalement sur la base des données de cette méthode relatives à l'identification des substances non classées vs classées qu'ont été définies les valeurs de spécificité et de sensibilité des normes de performance originales*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (VRM)	EpiDerm™ (<i>version originale</i>) : au départ, cette méthode d'essai a été soumise à une étude de validation prospective complète en même temps que la méthode n°1, entre 2003 et 2007. Les éléments de cette méthode d'essai ont servi à définir les éléments essentiels des normes de performance du CEVMA, originales et actualisées* (39) (40) (21). EpiDerm™ SIT (EPI-200) : une modification de la méthode d'origine EpiDerm™ a été validée en 2008 sur la base des normes de performance originales du CEVMA* (21) en 2008.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33) (2) (21) (22) (23) (31)
3	SkinEthic™	Étude de validation fondée sur les	(2) (22) (23) (24)

	RHE	normes de performance originales du CEVMA* (22) en 2008	(29)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Étude de validation (2011-2012) basée sur les normes de performance de la LD 439 de l'OCDE (8), qui sont fondées sur les normes de performance du CEVMA mises à jour*(39) (40)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) et normes de performance de la présente LD (8)*
5	epiCS®	Étude de validation basée sur les normes de performance pour SIT selon OCDE GD 220 (8), avis de l'ESAC suivant en 2016 (45) et examen indépendant par les pairs en 2018 (43)	(1) (8) (23) (39) (40) (42) (43) (46)
6	Skin+	Etude de validation basée sur la performance pour SIT selon OCDE GD 220 (8), après l'avis de l'ECVAM en 2016 (46) et l'examen indépendant par les pairs en 2018 (43)	(1) (8) (23) (39) (40) (44) (43) (45) (46)
7	KeraSkinTM SIT	Etude de validation basée sur la performance pour SIT selon OCDE GD 220 (8), suivi d'une revue indépendante en 2020.	(48) (49) (50) (51)

Notes:

*) Les normes de performance du CEVMA d'origine (21) ont été développées en 2007 à l'issue de l'étude de validation prospective (16) qui avait évalué les performances des méthodes d'essai n°1 et 2 sur la base du système de classification de l'UE tel que décrit dans la 28^e modification de la Directive sur les substances dangereuses (41). En 2008 a été adopté le système SGH de l'ONU (1), qui a porté de fait la valeur seuil servant à distinguer les substances non classées des substances classées d'un score in vivo de 2.0 à 2.3. Pour prendre en compte cette évolution des exigences réglementaires, les valeurs de précision et la liste des produits chimiques de référence des normes de performance du CEVMA ont été mises à jour en 2009 (2) (39) (40). Comme les normes de performance d'origine, les normes de performance actualisées s'appuient largement sur les données issues des méthodes n°1 et 2 (17), mais elles utilisent aussi des données sur les produits chimiques de référence tirées de la méthode n°3. En 2010, les normes de performance actualisées du CEVMA ont servi à définir les normes de performance relatives à la présente Ligne directrice (8). Dans le cadre de la présente Ligne directrice, EpiSkin TM est considérée comme la MRV, car elle a été utilisée pour définir les critères élaborés dans les normes de performance. Le document explicatif du CEVMA/BfR accompagnant la présente LD de l'OCDE (23) donne des informations détaillées sur les études de validation, présente une compilation des données produites ainsi que des informations contextuelles sur les adaptations à apporter aux normes de performance compte tenu de la mise en œuvre du système SGH de l'ONU.

SIT : essai d'irritation cutanée (Skin Irritation Test)

RHE : épiderme humain reconstitué (Reconstructed Human Epidermis).

ANNEXE 3

PARAMÈTRES DES PROTOCOLES SPÉCIFIQUES À CHAQUE MÉTHODE D'ESSAI FIGURANT DANS LA PRÉSENTE LD

Tableau 2 : Vue d'ensemble des paramètres des protocoles pour chaque méthode ouverte par cette Ligne directrice

Les méthodes sur épiderme humain reconstitué (RhE) présentent des protocoles très similaires, utilisant notamment toutes une période post-incubation de 42 heures à 37°C (32) (33) (34) (35)(42) (44)(48) . Les variations concernent essentiellement trois paramètres liés aux différentes fonctions de barrière des méthodes d'essai, à savoir : A) temps et volume préincubation, B) application des produits chimiques testés et C) volume post-incubation.

No	1	2	3	4	5	6	7
	EpiSkin™ (SM) (non disponible dans le commerce)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	epiCS	Skin+	KeraSkin™ SIT (48)
A) Préincubation							
Temps d'incubation	18-24 heures	18-24 heures	= 2 heures	15-30 heures	4 heures ou toute la nuit	2 heures ou toute la nuit	20-24 heures
Volume de milieu	2 mL	0.9 mL	3 ou 1 mL	0.5 mL	1mL	1mL	0.9mL
B) Application du produit chimique							
Pour les liquides	10 µL (26 L/cm²)	30 µL (47 L/cm²)	16 µL (32 L/cm²)	25 µL (83 L/cm²)	30µL (50µL/cm²)	16µL (32µL/cm²)	40 µL (67 µL/cm²)
Pour les solides	10 mg (26 mg/cm²) + ED (5 L)	25 mg (39 mg/cm²) + SSTPD	16 mg (32 mg/cm²) + ED (10 L)	25 mg (83 mg/cm²) + ED (25 L)	30mg (50mg/cm²) + DPBS	16µL	40 mg (67 mg/cm²) + DPBS (40

		(25L)			(50µL)		µL)
Utilisation de tulle de nylon	pas utilisé	si nécessaire	appliqué	pas utilisé	appliqué	appliqué	Not used
Temps d'application total	15 minutes	60 minutes	42 minutes	15 minutes	20 minutes	42 minutes	30 minutes
Température d'application	TA	a) à TA pendant 25 minutes b) à 37°C pendant 35 minutes	TA	TA	TA	TA	37°C
C) Volume post-incubation							
Volume de milieu	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL	1mL	2mL	0.9mL
Solution de MTT	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0.5 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 0.5 mg/mL	300 µL 0.4 mg/mL
D) Critères d'acceptabilité							
DO moyenne des réplicats de tissu traités par le contrôle négatif (eau ou DPBS)	≥ 0.6 and ≤ 1.5	≥ 0.8 and ≤ 2.8	≥ 0.8 and ≤ 3	≥ 0.7 and ≤ 2.5	≥ 0.8 and ≤ 2.8	≥ 0.8 and ≤ 2.5	≥ 0.7 and ≤ 1.6
Viabilité moyenne des réplicats de tissu traités avec le contrôle positif (SDS 5%) exprimé en % du contrôle négatif.	< 40%	< 20%	< 40%	< 40%	< 20 %	< 40%	$\leq 40\%$
Déviati on standard entre les réplicats de tissus	$DS \leq 18\%$	$DS \leq 18\%$	$DS \leq 18\%$	$DS \leq 18\%$	$DS \leq 18\%$	$DS \leq 18\%$	$SD \leq 18\%$

Note:

TA : température ambiante (18-25°C)

ED : eau distillée

SSTPD : solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco.

* la quantité est mesurée avec une cuillère calibrée comme décrit dans le SOP.

Table 3- Indicative ranges of cell viability values (%) obtained for each test method and proficiency substance

Les valeurs ci-dessous sont fournies à titre indicative et reflète les plages de valeurs obtenues par les laboratoires participants à l'étude de validation pour chacune des méthodes. Ces plages de valeurs ne font pas partie de la Ligne directrice mais peuvent être un repère utile pour les laboratoires mettant en place la méthode pour la première fois avant une utilisation en routine à des fins réglementaires.

	EpiSkin™ (SM) (23) (non disponible dans le commerce)	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)	SkinEthic RHE™ (23)	LabCyte EPI- MODEL24 SIT (26)	epiCS® (43)(44)	Skin+® (42)(43)	KeraSkin™ SIT (51)
SUBSTANCES NON CLASSEES (SGH Non classé)							
naphthalene acetic acid	92.3 +/-5.2	100.7 +/-8.4	104.0 +/- 12.9	100.4 +/-7.6	99.3 +/-10.4	94.6 +/-17.9	81.8 +/-15.0
isopropanol	88.1 +/-8.7	65.6 +/-16.5	101.0 +/-11.3	76.7 +/-7.0	97 +/-6.8	90.7 +/-27.5	76.6 +/-9.4
methyl stearate	98.5 +/-11.3	107.7 +/-4.9	104.4 +/-15.8	99.3 +/-10.4	101 +/-8.0	101.7 +/-6.5	93.4 +/-11.3
heptyl butyrate	102 +/-4.2	104.1 +/-4.2	92.1 +/-17.5	105.4 +/-11.1	100.3 +/-5.1	79 +/-17.8	87.3 +/-11.9
hexyl salicylate	89 +/-1.8	106.9 +/-5.2	95.9 +/-12.5	100.9 +/-8.2	95 +/-8.0	89.1 +/-16.3	88.3 +/-10.4
SUBSTANCES CLASSEES (SGH Catégorie 2)							
cyclamen aldehyde	25.4 +/-12.1	18.5 +/-16.2	1.7 +/- 0.9	9.1 +/-2.9	12.8 +/-26.4	3 +/-0.4	1.7 +/-3.0
1-bromohexane	24.4 +/-15.9	16.9 +/-2.5	1.3 +/-3.9	15.7 +/-3.4	10.4 +/-4.8	5.6 +/-0.7	18.9 +/-12.9

potassium hydroxide (5% aq.)	9.3+/-10.0	4.3 +/-1	16,7 +/-17	3.3 +/-3.1	2.6 +/-3.6	5.2 +/-1.5	-1.2 +/-2.0 ¹
1-methyl-3-phenyl- 1-piperazine	23.8+/-17.8	7.35 +/-2.7	8,2 +/-7.1	5.8 +/-3.7	38.8 +/-37.9	4.5 +/-0.7	5.4 +/-9.5
heptanal	16.6+/-13.6	5.1 +/-0.3	1.3 +/-0.9	9.9 +/-1.3	4.4 +/-4.9	9.3 +/-0.2	2.8 +/-2.8

¹ The negative value indicates mean cell viability close to the detection limit and variation in the data.

Table 4. Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif dans le test MTT inclus dans cette ligne directrice

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM)*	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
Skin+®	≥ 0.8	≤ 2.5
KeraSkin™ SIT	≥ 0.7	≤ 1.6

(*) : le modèle EpiSkin™ n'est plus disponible dans le commerce depuis décembre 2024.

Tableau 5. Critères de contrôle de qualité des lots pour les méthodes d'essais comprises dans la présente LD

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM)* (18 heures de traitement par SDS) (32)	CI ₅₀ = 1.0 mg/mL	CI ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	TE ₅₀ = 4.8 h	TE ₅₀ = 8.7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	TE ₅₀ = 4.0 h	TE ₅₀ = 9.0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 heures de traitement par le SDS) (35)	CI ₅₀ = 1.4 mg/mL	CI ₅₀ = 4.0 mg/mL
epiCS® (1% Triton-X-100) (44)	TE _{50table} = 2.0 hr	TE ₅₀ = 7.0 hr
Skin+® (1% Triton-X-100) (42)	TE ₅₀ = 4.0 hr	TE ₅₀ = 9.0 hr
KeraSkin™ SIT (18 heures de traitement avec SDS) (48)	IC ₅₀ = 1.5 mg/mL	IC ₅₀ = 4.8 mg/mL

(*) : le modèle EpiSkin™ n'est plus disponible dans le commerce depuis décembre 2024.

ANNEXE 4

PRINCIPAUX PARAMÈTRES ET CRITÈRES D'ACCEPTATION DE LA PREUVE D'EFFICACITÉ D'UN SYSTÈME CLHP/CLUP-SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR LA MESURE DU FORMAZAN EXTRAIT D'UN MODÈLE TISSULAIRE D'ÉPIDERME HUMAIN RECONSTRUIT

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (29)(31)	Critères d'acceptation
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, du blanc vivant (extrait de modèle tissulaire d'EChR vivant sans traitement dans l'isopropanol), blanc tué (extrait de modèle tissulaire d'EChR tué sans traitement dans l'isopropanol), et d'un colorant (bleu de méthylène, par exemple)	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20\%$ $\text{Surface}_{\text{VLIQ}}^1$
Fidélité	Contrôles de qualité (c'est-à-dire, bleu de formazan à 1.6 µg/mL, 16 µg/mL et 160 µg/mL) dans l'isopropanol (n=5)	$\text{CV} \leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la VLIQ
Justesse	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Écart $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la VLIQ
Effet de matrice	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	Effet de matrice compris entre 85 % et 115 %
Effet résiduel	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ ² normale	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20\%$ $\text{Surface}_{\text{VLIQ}}$
Répétabilité (même jour)	3 courbes d'étalonnage indépendantes (établies sur la base de 6 dilutions de formazan au 1/3 consécutives dans l'isopropanol, avec point de départ VLSQ, soit 200 µg/mL) ; Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Courbes d'étalonnage : % Écart $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la VLIQ
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1 : 1 courbe d'étalonnage et Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2 : 1 courbe d'étalonnage et Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3 : 1 courbe d'étalonnage et Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	Contrôles de qualité : % Écart $\leq 15\%$ et $\text{CV} \leq 15\%$
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3)' analysé le jour de la préparation et après une conservation de 24 heures à température ambiante (18-25°C)	% Écart $\leq 15\%$
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3)' analysé le jour de la préparation et après une conservation de plusieurs jours à -20°C	% Écart $\leq 15\%$

Notes:

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

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