

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

Irritation cutanée *in vitro*: essai sur épiderme humain reconstitué

INTRODUCTION

1. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'un produit chimique pendant une période allant jusqu'à quatre heures [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 à plusieurs niveaux (4).

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 et 2002] (4). Par souci du bien-être animal, la LD 404 comporte un supplément afin de que la corrosion/irritation cutanée puisse être déterminée *via* une stratégie d'essai à plusieurs niveaux, faisant appel à des méthodes d'essai *in vitro* ou *ex vivo* validées, de manière à éviter d'infliger des souffrances aux animaux. 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), qui sont destinées au volet « corrosivité » de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le supplément à la LD 404 (4).

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. La présente Ligne directrice comprend également un ensemble de normes de performance ([annexe 2](#)) développé par EC-ECVAM (8) (9) 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 (10) (voir l'[annexe 4](#)).

4. Des études de pré-validation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour quatre méthodes d'essai *in vitro* disponibles dans le commerce (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (35) (36) (37) (38) (39) utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué. Ces quatre méthodes d'essai sont comprises dans la présente Ligne directrice et 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, trois de ces méthodes ont été utilisées pour développer la

© OCDE, (2013)

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

présente Ligne directrice, y compris les normes de performance (annexe 4), et sont référencées à l'annexe 2 et à l'annexe 4 comme les méthodes de référence validées (MRV).

5. L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie pour les méthodes d'essai validées selon les normes de performance figurant à l'annexe 4 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.

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

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. 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 (17), 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. Lorsqu'elle est utilisée en tant que méthode d'essai partiellement substitutive, un essai ultérieur *in vivo* peut être nécessaire pour compléter la caractérisation du potentiel d'irritation cutanée (4). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

8. La présente Ligne directrice se rapporte au volet « irritation cutanée *in vitro* » de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le supplément à la LD 404 pour les essais d'irritation/corrosion cutanée (4). 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 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 (17) (19) (24). 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 (25). 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. Il convient aussi de noter que les produits chimiques fortement colorés peuvent interférer avec les mesures de la viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger ces interférences (voir les paragraphes 24-26).

9. 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

10. 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*.

11. 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 (25). 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 (17) (18), en l'absence de toute vascularisation du système d'essai *in vitro*, grâce à la lecture de la viabilité cellulaire.

12. La viabilité cellulaire des modèles 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 (25). 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 produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants ($> 50\%$, sans catégorie).

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'une des quatre 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 produits chimiques énumérés au tableau 1.

14. 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. 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.

Tableau 1: Produits chimiques utilisés pour les épreuves de compétence¹

Produit chimique	Numéro CAS	Score <i>in vivo</i> ²	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU
PRODUITS CHIMIQUES NON CLASSÉS				
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
PRODUITS CHIMIQUES CLASSÉS				
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2.3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane	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	5271-27-2	3.3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3.4	liquide	catégorie 2

¹ Ces produits chimiques constituent un sous-ensemble des produits chimiques utilisés dans l'étude de validation.

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 ».

PROTOCOLE

15. 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 quatre méthodes d'essai contenues dans la présente Ligne directrice (27) (28) (29) (40).

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 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, mycoplasmaïque ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

17. La viabilité est mesurée au moyen du colorant MTT (26). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). La densité optique (DO) du solvant d'extraction seul est suffisamment faible, c'est-à-dire < 0.1. 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 quatre méthodes validées sont indiquées dans le tableau 2. 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.

Tableau 2: Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif.

	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

Fonction de barrière

18. 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 3).

Morphologie

19. 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

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

Contrôle de qualité

21. 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 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. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} 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 quatre méthodes comprises dans la présente Ligne directrice sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3: 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)(27)	$CI_{50} = 1.0$ mg/ml	$CI_{50} = 3.0$ mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(28)	$TE_{50} = 4.8$ h	$TE_{50} = 8.7$ h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(29)	$TE_{50} = 4.0$ h	$TE_{50} = 9.0$ h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 heures de traitement par le SDS)	$CI_{50} = 1.4$ mg/ml	$CI_{50} = 4.0$ mg/ml

Application des produits chimiques testés et des substances témoins

22. 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, sans pour autant utiliser une dose infinie, 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 si nécessaire (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).

23. 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

24. 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 (12)(13)(14)(15)(16).

25. Le test du MTT est une méthode quantitative validée, 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.

26. 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. 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 quatre méthodes d'essai validées contenues dans cette Ligne directrice (27) (28) (29) (40).

Critères d'acceptabilité

27. Pour chaque méthode d'essai faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 21), 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 (27) (28) (29) (40). Les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les répliquats 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

28. 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 %. 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 considéré comme irritant pour la peau conformément à la catégorie 2 du SGH de l'ONU si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieure ou égale (\leq) à 50 %.
- Selon la réglementation des pays membres, 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

29. 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

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

Produit chimique testé et témoin :

- nom(s) chimique(s), tels que le nom CAS, et le cas échéant, le numéro CAS;
- pureté et composition du produit chimique (en pourcentage en poids);
- propriétés physico-chimiques importantes pour l'exécution de l'essai (par exemple, état physique, stabilité, volatilité, pH et hydrosolubilité, s'ils sont connus);
- le cas échéant, traitement du produit chimiques testé/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);
- conditions de stockage;

Justification du choix du modèle d'épiderme humain reconstitué et du protocole utilisé;

Conditions de l'essai:

- système cellulaire utilisé;
- 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) reproductibilité et valeur prédictive;
- v) contrôles de qualité (CQ) du modèle;
- détails du protocole utilisé;
- doses d'essai utilisées, durée de l'exposition et de la période d'incubation post-traitement;
- description de toute modification éventuelle du protocole;
- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative):
 - i) acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots;
 - ii) acceptabilité des valeurs des témoins positifs et négatifs par rapport aux moyennes et aux fourchettes des témoins positifs et négatifs;
- description des critères d'évaluation utilisés, notamment justification du choix des valeurs-seuils pour le modèle prédictif;
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou pour les produits chimiques d'essai colorants;

Résultats :

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque produit chimique d'essai pour chaque essai et chaque mesure de réplicat, accompagnés de la moyenne, de l'écart-type et de la classification résultante;
- résultat des contrôles utilisés pour les réducteurs direct du MTT et ou/des produits chimiques colorants ;
- description des autres effets observés;

Discussion des résultats

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Nations Unies (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, ONU New York et Genève, 2007, disponible à l'adresse suivante : http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html].
- 2) EC-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 suivante: [\[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing\]](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing)
- 3) EC (2008), REGULATION (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Union L353, 1-1355.
- 4) OCDE (2004), *Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Ligne directrice n° 404, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)
- 5) OCDE (2004), *Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (TER)*, Ligne directrice n° 430, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)
- 6) OCDE (2004), *Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine*, Ligne directrice n° 431, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)
- 7) OCDE (2006), *Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée*, Lignes directrices n° 435, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)
- 8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE), disponible à l'adresse suivante: [\[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing\]](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing). NB : cette version des standards de performance est en vigueur, telle que mise à jour en 2009 en vue de la mise en œuvre du SGH de l'O.N.U.
- 9) EC-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 suivante: [\[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing\]](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing)
- 10) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 34, [ENV/JM/MONO\(2005\)14](http://www.oecd.org/env/testguidelines), OCDE, Paris. Disponible en anglais à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.

- 14) 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.
- 15) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. et Rubinsteen, 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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 suivante: **[Error! Hyperlink reference not valid.**http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing**]**
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) EC-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 suivante: **[Error! Hyperlink reference not valid.**http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing**]**
- 22) EC-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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing**]**, ceux-ci sont les standards de performance originaux utilisés pour la validation de deux méthodes d'essai. Ces standards de performance ne devraient plus être utilisés puisqu'une nouvelle version (8) est disponible à présent.
- 23) EC-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 suivante: **[Error! Hyperlink reference not valid.**http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing**]**
- 24) OCDE (2010), Document explicatif accompagnant le projet de Ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée *in vitro*. Publié dans la Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 137, OCDE, Paris. Disponible en ligne à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=en/jm/mono\(2010\)36&doclanguage=en\]](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=en/jm/mono(2010)36&doclanguage=en)
- 25) 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.

- 26) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 27) 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]
- 28) 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://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
- 29) 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 suivante: **[Error! Hyperlink reference not valid.**http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
- 30) 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.
- 31) 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'étiquetage des substances dangereuses, *Journal officiel des Communautés européennes* **L225**, 1-333.
- 32) Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. et Robinson, M. K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test, *Contact Dermatitis* 51, 1-4.
- 33) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejllova, K., Bendova, H., Marriott, M. et Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *AATEX*, 14, 359-365.
- 34) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. et Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.
- 35) 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
- 36) 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
- 37) OECD (2011), Validation report for the skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 159, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 38) OECD (2011), Peer review report of validation of the skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL24, OECD Series on Testing and Assessment No. 155, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 39) 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.
- 40) LabCyte EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3 (June 2011), Skin irritation test using the reconstructed human model "LabCyte EPI-MODEL24" Available at: [<http://jacvam.jp/>]

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 (10).

Dose infinie : quantité de produit chimique testé appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

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 (10).

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 (10).

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 (30). 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.

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 (10).

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (10).

Précision : degré de conformité entre les résultats 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 (10).

Produit chimique : désigne une substance ou un mélange.

Produits chimiques de référence : produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence *in vitro* ou *in vivo* ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels la méthode d'essai est conçue, qu'elles soient fortes, faibles, ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (10).

Règlement CLP de l'UE (règlement de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges) : vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges)(3).

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 (10).

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 (10).

Stratégie d'essai à plusieurs niveaux : essai faisant appel à plusieurs méthodes de manière séquentielle; les méthodes d'essai sélectionnées à chaque niveau sont déterminées par les résultats du niveau d'essai précédent (10).

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.

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.

ANNEXE 2

MÉTHODES D'ESSAI FIGURANT DANS CETTE LD

N°	Nom de la méthode d'essai	Type d'étude de validation	Références
1	EpiSkin™	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* (8) (9) (22). 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) (8) (9) (11) (12) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (24) (27)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (version originale) : 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* (8) (9) (22). 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* (22).	(2) (8) (9) (11) (13) (14) (16) (17) (18) (19) (21) (22) (24) (28) (2) (22) (23) (24) (28)
3	SkinEthic™ RHE	Étude de validation fondée sur les normes de performance originales du CEVMA* (22) en 2008	(2) (22) (23) (24) (29)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Étude de validation (2011-2012) basée sur les normes de performance de la LD 439 de l'OCDE, qui sont fondées sur les normes de performance du CEVMA mises à jour*(8) (9)	(8) (9) (35) (36) (37) (38) (39) (40) et normes de performance de la présente LD*

*) Les normes de performance du CEVMA d'origine (22) ont été développées en 2007 à l'issue de l'étude de validation prospective (17) 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 (31). En 2008 a été adopté le système SGH de l'ONU (1) (3), 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) (8) (9). 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 présentées dans cette LD (annexe 4). Les méthodes n°1, 2 et 3 [à savoir EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) et SkinEthic™ RHE] ayant servi à définir la présente LD, y compris ses normes de performance, elles sont considérées comme des méthodes de référence validées (MRV) (annexe 4). Le document explicatif du CEVMA/BfR accompagnant la présente LD de l'OCDE (24) 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**

Les méthodes sur épiderme humain reconstitué (RhE) présentent des protocoles très similaires, utilisant notamment toutes une période post-incubation de 42 heures (27) (28) (29). 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.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI- MODEL24 SIT
A) Préincubation				
Temps d'incubation	18-24 heures	18-24 heures	< 2 heures	15-30 heures
Volume de milieu	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
B) Application du produit chimique				
Pour les liquides	10 µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	25 µL (83 µL/cm ²)
Pour les solides	10 mg (26 mg/cm ²) + ED (5 µL)	25 mg (39 mg/cm ²) + SSTPD (25µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + ED (10 µL)	25 mg (83 mg/cm ²) + ED (25 µL)
Utilisation de tulle de nylon	pas utilisé	si nécessaire	appliqué	pas utilisé
Temps d'application total	15 minutes	60 minutes	42 minutes	15 minutes
Température d'application	TA	a) à TA pendant 25 minutes b) à 37°C pendant 35 minutes	TA	TA
C) Volume post-incubation				
Volume de milieu	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL
D) Variabilité maximale acceptable				
Écart-type entre répliquats de tissu	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18

TA : température ambiante

ED : eau distillée

SSTPD : solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco

ANNEXE 4**NORMES DE PERFORMANCE POUR L'ÉVALUATION DE MÉTHODES SIMILAIRES OU MODIFIÉES PROPOSÉES POUR LES ESSAIS D'IRRITATION CUTANÉE *IN VITRO* SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ**

(à l'intention des développeurs de nouvelles méthodes ou de méthodes similaires modifiées)

1. Généralement, l'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement) ou non. Conçues à partir de méthodes d'essai validées et acceptées, les normes suivantes ont été définies sur la base de trois méthodes de référence validées et acceptées et peuvent également servir à évaluer la fiabilité et la précision d'autres méthodes d'essai analogues (aussi appelées « essais répliques »), fondées sur des principes scientifiques similaires et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (10).

2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est à dire les améliorations proposées d'une méthode d'essai approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation sera le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (10).

3. La fiabilité et la précision des méthodes d'essai similaires ou des variantes de l'une des trois méthodes de référence validées (MRV, voir annexe 2), utilisées pour définir les normes de performance seront évaluées, au préalable de leur inclusion dans cette Ligne directrice, à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des scores d'irritation de Draize afin de déterminer leur fiabilité et leur précision. Les valeurs de fiabilité et de précision obtenues, lors de l'évaluation des méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées, à l'aide des 20 produits chimiques de référence recommandés dans les normes de performance (tableau 1) sont comparables à celles obtenues par la MRV ou meilleures que celles-ci (tableau 2 de la présente annexe) (2) (17). Les valeurs de fiabilité et de précision à atteindre sont indiquées aux paragraphes 8 à 12 de la présente annexe. Des substances non classées (« sans catégorie » dans le SGH de l'ONU) et classées (catégorie 2 du SGH de l'ONU) (1) représentant différentes classes chimiques sont incluses. Avant d'appliquer une méthode d'essai pour tester de nouveaux produits chimiques, il convient de déterminer sa fiabilité et son aptitude à détecter correctement les substances chimiques irritantes de la catégorie 2 du SGH de l'ONU ainsi que, selon la réglementation des pays membres, son aptitude à détecter correctement les substances chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH (pour les pays membres n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative du SGH).

4. Ces normes de performance sont fondées sur celles du CEVMA (8), mises à jour conformément aux systèmes SGH de l'ONU et CLP de l'UE sur la classification et l'étiquetage (1) (2) (9). Les normes de performance d'origine (22) ont été définies à l'issue de l'étude de validation (17) et établies sur la base du système de classification de l'UE tel que décrit dans la 28^{ème} modification de la directive sur les substances dangereuses (31). Suite à l'adoption par l'UE du système SGH de l'ONU pour la classification et l'étiquetage des substances chimiques (CLP de l'UE) (3), intervenue entre la finalisation de l'étude de validation et l'achèvement de la présente Ligne directrice, les normes de performance ont été mises à jour (8) (9). Les modifications portent sur la composition des produits chimiques de référence utilisés dans les normes de performance; et les valeurs définies pour la fiabilité et la précision (2) (9) (24).

5. Les normes de performance se composent des trois éléments suivants (9):

- I) les éléments essentiels de la méthode d'essai ;
- II) une liste minimale de produits chimiques de référence ;
- III) des valeurs définies de fiabilité et de précision.

I) Éléments essentiels de la méthode d'essai

6. Il s'agit des éléments structurels, fonctionnels et procéduraux essentiels d'une méthode d'essai validée qui figurent dans le protocole de toute méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire ou modifiée proposée. Ces éléments recouvrent les caractéristiques propres de la méthode d'essai, la description des points clés de la procédure et les mesures de contrôle de qualité. Le respect de ces éléments essentiels contribuera à garantir que les méthodes similaires ou modifiées proposées sont fondées sur les mêmes concepts que les méthodes d'essai validées utilisées pour établir les normes de performance (10). Les éléments essentiels de la méthode d'essai sont décrits en détail aux paragraphes 16 à 21 de la présente Ligne directrice :

- Conditions générales (paragraphe 16)
- Conditions fonctionnelles, comprenant :
 - o viabilité (paragraphe 17) ;
 - o fonction de barrière (paragraphe 18) ;
 - o morphologie (paragraphe 19) ;
 - o reproductibilité (paragraphe 20) ;
 - o contrôle de qualité (paragraphe 21).

Concernant les paramètres spécifiques (p.ex pour les tableaux 2 et 3), des valeurs appropriées doivent être fournies pour toute méthode nouvelle similaire ou modifiée ; ces valeurs spécifiques peuvent varier selon la méthode en question.

II) Liste minimale de produits chimiques de référence

7. Les produits chimiques de référence sont utilisés pour déterminer si la performance (fiabilité et la précision) d'une méthode d'essai proposée similaire ou modifiée est comparable ou supérieure à celle des MRV (2) (8) (9) (17) (24). Une évaluation sur la base de ces produits chimiques de référence ne peut être effectuée que pour les méthodes dont on a démontré qu'elles étaient suffisamment similaires à la MRV sur le plan structurel et fonctionnel ou qu'elles représentaient une modification mineure par rapport à l'une des trois méthodes d'essai validées utilisées pour établir les présentes normes de performance. Les 20 produits chimiques de référence recommandés figurant dans le tableau 1 de cette annexe comprennent des substances représentant différentes classes chimiques (catégories chimiques basées sur des groupes fonctionnels) et représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances fortement irritantes). Le tableau comprend dix substances classées dans la catégorie 2 du SGH de l'ONU et 10 substances non classées, parmi lesquelles trois relèvent de la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU. Aux fins de la présente Ligne directrice, la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU équivaut à « sans catégorie ». Les produits chimiques figurant dans le tableau 1 sont sélectionnés sur la base de données issues des MRV et ont trait aux produits chimiques utilisés dans l'étude de validation prospective (17), ainsi que ceux qui ont été utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de pré-validation. Leurs fonctions chimique et leur état physique ont été dûment pris en compte lors de l'élaboration de cette liste (15) (19). Ces produits chimiques de référence représentent le nombre minimal de substances à utiliser pour évaluer la précision et la fiabilité d'une

méthode d'essai proposée similaire ou modifiée, mais ne sont pas utilisés pour le développement de nouvelles méthodes d'essai. Si une substance du tableau n'est pas disponible, il est possible d'utiliser d'autres produits chimiques pour lesquels il existe des données de référence *in vivo* appropriées, choisis en premier lieu parmi ceux utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de pré-validation ou de validation de la MRV. Si nécessaire, il est possible d'ajouter à cette liste minimale d'autres produits chimiques représentant d'autres classes chimiques et pour lesquels on dispose de données de référence *in vivo* appropriées, afin d'évaluer plus avant la précision de la méthode d'essai proposée.

Tableau : Liste minimale de produits chimiques de référence pour la détermination des valeurs de précision et de fiabilité de méthodes d'essai d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées¹

Produit chimique	Numéro CAS	État physique	Score <i>in vivo</i>	Cat. déterminée par la MRV <i>in vitro</i>	Cat. SGH déterminée <i>in vivo</i>
PRODUITS CHIMIQUES NON CLASSÉS					
1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	liquide	0	cat. 2	sans catégorie
phtalate de diéthyle	84-66-2	liquide	0	sans catégorie	sans catégorie
acide naphtylacétique	86-87-3	solide	0	sans catégorie	sans catégorie
phénoxyacétate d'allyle	7493-74-5	liquide	0.3	sans catégorie	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	liquide	0.3	sans catégorie	sans catégorie
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	liquide	1	cat. 2	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	solide	1	sans catégorie	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	liquide	1.7	sans catégorie	sans catégorie (cat. 3 facult.)
salicylate d'hexyle	6259-76-3	liquide	2	sans catégorie	sans catégorie (cat. 3 facult.)
cinnamaldéhyde	104-55-2	liquide	2	cat. 2	sans catégorie (cat. 3 facult.)
PRODUITS CHIMIQUES CLASSÉS					
décane-1-ol ²	112-30-1	liquide	2.3	cat. 2	cat. 2
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	liquide	2.3	cat. 2	cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	liquide	2.7	cat. 2	cat. 2
hydrochlorure de 2-chlorométhyl-4-méthoxy-3,5 diméthyl pyridine	86604-75-3	solide	2.7	cat. 2	cat. 2
Disulfure de dipropyle ²	629-19-6	liquide	3	sans catégorie	cat. 2
hydroxyde de potassium (sol. aqueuse à 5 %)	1310-58-3	liquide	3	cat. 2	cat. 2

Méthyl-2 tert-butyle-5 thiophénol; thio PTBT	7340-90-1	liquide	3.3	cat. 2	cat. 2
1-méthyl-3-phényl-1- pipérazine	5271-27-2	solide	3.3	cat. 2	cat. 2
heptanal	111-71-7	liquide	3.4	cat. 2	cat. 2
tétrachloréthylène	127-18-4	liquide	4	cat. 2	cat. 2

¹ La sélection des produits chimiques se fonde sur les critères suivants : (i) les substances sont disponibles dans le commerce ; (ii) elles sont représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances très irritantes) ; (iii) elles ont une structure chimique bien définie ; (iv) elles sont représentatives de la fonctionnalité chimique utilisée pour la validation ; (v) elles ne sont pas associées à un profil extrêmement toxique (cancérogène ou toxique pour la reproduction, par exemple) ni à des coûts d'élimination prohibitifs.

² Substances irritantes chez le lapin, mais pour lesquelles il existe des preuves fiables de leur caractère non irritant chez l'homme (32) (33) (34).

III) Valeurs définies de fiabilité et de précision

8. Afin d'établir la fiabilité et la précision de méthodes d'essais similaires ou modifiées proposées destinées à des transferts entre laboratoires, les 20 produits chimiques de référence du Tableau 1 sont testés dans au moins trois laboratoires différents. Cependant, si la méthode d'essai est destinée à être utilisée dans un seul laboratoire, un essai inter-laboratoires n'est pas indispensable à la validation. Il est toutefois essentiel que ces études de validation soient évaluées de manière indépendante par des organismes de validation reconnus au niveau international, conformément aux lignes directrices internationales en la matière (10). Dans chaque laboratoire, les 20 produits chimiques de référence font tous l'objet de trois essais indépendants les uns des autres, réalisés sur des lots de tissus différents et à des intervalles de temps suffisamment espacés. Chaque essai comporte au moins trois réplicats de tissus testés simultanément pour chaque produit chimique d'essai, TN et TP.

9. Le calcul des valeurs de la fiabilité et de la précision de la méthode d'essai proposée est effectué en tenant compte des quatre critères ci-dessous, afin de garantir qu'il est réalisé de manière prédéfinie et cohérente :

1. Seules les données issues de séquences d'essais complètes peuvent être utilisées pour le calcul de la variabilité intra-laboratoire ou inter-laboratoires de la méthode d'essai et de la valeur prédictive (précision).
2. La classification finale de chaque produit chimique de référence dans chaque laboratoire participant est obtenue en utilisant la valeur moyenne de la viabilité constatée lors des différents essais réalisés dans le cadre d'une séquence d'essais complète.
3. Seules les données obtenues pour des produits chimiques dont les séquences d'essai ont été complétées dans tous les laboratoires participants sont retenues pour le calcul de la variabilité inter-laboratoires de la méthode d'essai.
4. Le calcul des valeurs de précision est réalisé en utilisant les prévisions individuelles des laboratoires obtenues pour les 20 produits chimiques de référence par les différents laboratoires participants.

Dans ce contexte, une **séquence d'essais** consiste en trois essais réalisés de manière indépendante dans un laboratoire pour un produit chimique testé donné. Une **séquence d'essais complète** est une séquence

d'essais réalisée dans un laboratoire pour un produit chimique testé, et pour laquelle les trois essais sont recevables. Cela signifie que tout essai non recevable annule la séquence entière des trois essais.

Reproductibilité intra-laboratoire

10. L'évaluation de la répétabilité intra-laboratoire doit faire apparaître une concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU et « sans catégorie ») obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par un même laboratoire qui soit supérieure ou égale (\geq) à 90 %.

Reproductibilité inter-laboratoires

11. Il n'est pas indispensable d'évaluer la reproductibilité inter-laboratoires si la méthode d'essai proposée n'est utilisée que dans un seul laboratoire. En ce qui concerne les méthodes destinées à être transférées d'un laboratoire à l'autre, la concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU et « sans catégorie ») obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par au moins trois laboratoires (de préférence), est supérieure ou égale (\geq) à 80 %.

Valeur prédictive

12. La valeur prédictive (sensibilité, spécificité et précision) de la méthode d'essai similaire ou modifiée proposée doit être comparable ou supérieure à celle de la MRV, en tenant compte des informations supplémentaires relatives à sa pertinence pour les espèces étudiées (tableau 2 de cette annexe). La sensibilité est supérieure ou égale (\geq) à 80 % (2) (8) (9) (24). Toutefois, une restriction spécifique supplémentaire s'applique à la sensibilité de la méthode d'essai *in vitro* proposée, à savoir que seules deux substances de référence *in vivo* de catégorie 2, le décane-1-ol et le disulfure de dipropyle, peuvent être classées de manière erronée comme « sans catégorie » par plus d'un laboratoire participant. La spécificité de la méthode d'essai *in vitro* proposée est supérieure ou égale (\geq) à 70 % (2) (8) (9) (24). Il n'existe aucune restriction supplémentaire concernant la spécificité de la méthode d'essai *in vitro* proposée, c'est-à-dire que tout laboratoire participant peut classer de manière erronée comme « sans catégorie » une substance *in vivo*, pourvu que la spécificité finale de la méthode d'essai reste dans la fourchette acceptable. La précision doit être supérieure ou égale (\geq) à 75 % (2) (8) (9) (24). Bien que la sensibilité de la MRV calculée pour les 20 produits chimiques de référence figurant dans le tableau 1 soit égale à 90 %, la valeur de sensibilité minimum nécessaire pour qu'une méthode d'essai similaire ou modifiée soit considérée comme valable est fixée à 80 %, étant donné que le décane-1-ol (substance à la limite entre deux catégories) et le disulfure de dipropyle (un faux négatif de la MRV) sont connus pour être des produits non irritants chez l'homme (32) (33) (34), même s'ils ont été identifiés comme irritants lors de l'essai chez le lapin. Les modèles d'épiderme humain reconstitué étant construits à l'aide de cellules d'origine humaine, ils prédiront sans doute l'absence d'effets irritants de ces substances (« sans catégorie » dans le SGH de l'ONU).

Tableau 2: Valeurs prédictives requises pour la sensibilité, la spécificité et la précision pour qu'une méthode d'essai similaire ou modifiée soit considérée comme valable

Sensibilité	Spécificité	Précision
$\geq 80 \%$	$\geq 70 \%$	$\geq 75 \%$

Critères d'acceptation de l'étude

13. Il est possible qu'un ou plusieurs essai(s) relatif(s) à une ou plusieurs produit(s) chimique(s) testé(s) ne remplisse(nt) pas les critères d'acceptation pour les produits chimiques testés et témoins, ou qu'il(s) ne soi(en)t pas acceptable(s) pour d'autres raisons. Afin de compléter les données manquantes, deux essais supplémentaires au maximum pour chaque produit chimique testé sont autorisés (nouvel essai). Plus précisément, étant donné qu'en cas de nouvel essai, les TP et TN sont également testés simultanément, deux essais supplémentaires au maximum peuvent être réalisés pour chaque produit chimique testé.

14. Il est possible que, même après un nouvel essai, le nombre minimum de trois essais valables nécessaire pour chaque substance testée ne soit pas atteint pour tous les produits chimiques de référence dans tous les laboratoires participants, et que par conséquent la matrice de données obtenue soit incomplète. Dans ce cas, il convient de respecter les trois critères suivants afin de pouvoir considérer les jeux de données comme acceptables:

1. les 20 produits chimiques de référence font l'objet d'au moins une séquence d'essais complète ;
2. dans au moins trois laboratoires participants, au minimum 85 % des séquences d'essais sont complètes (pour 20 produits chimiques, cela signifie trois séquences d'essais non recevables autorisées dans un seul laboratoire) ;
3. au minimum 90 % de toutes les séquences d'essais possibles issues d'au moins trois laboratoires sont complètes (pour 20 produits chimiques testés dans trois laboratoires, cela signifie six séquences d'essais non recevables autorisées au total).