

**LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE
PRODUITS CHIMIQUES****CORROSION CUTANÉE *IN VITRO* : ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE****INTRODUCTION**

1. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent par une nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique testé [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU)] (1). La présente Ligne directrice 431 mise à jour propose une procédure *in vitro* permettant d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1). Elle permet aussi une sous-catégorisation partielle des produits chimiques corrosifs.

2. Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée a impliqué le recours à des animaux de laboratoire (Ligne directrice de l'OCDE n° 404 (LD 404), adoptée en 1981 et révisée en 1992 et 2002) (2). Par souci du bien-être animal, la LD 404 recommande d'utiliser, pour déterminer la corrosion et l'irritation cutanées, une stratégie d'essai à plusieurs niveaux faisant appel à des méthodes d'essai *in vitro* ou *ex vivo* validées qui évitent d'infliger des souffrances aux animaux. Outre la LD 431 (adoptée initialement en 2004) (3), deux autres méthodes d'essai de corrosivité *in vitro* ont été validées et adoptées ; elles constituent les Lignes directrices de l'OCDE 430 (4) et 435 (5). Trois méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées en tant que LD 439 de l'OCDE (6), à utiliser pour le volet « irritation cutanée » de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux de la LD 404 (2).

3. La présente Ligne directrice porte sur le danger de corrosion cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un épiderme humain reconstitué (obtenu à partir de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain) qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire de l'épiderme. Cette Ligne directrice a été initialement adoptée en 2004, puis mise à jour en 2013 et 2014 afin d'inclure un ensemble de normes de performance (annexe I) pour l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées (7), conformément aux principes du document d'orientation n° 34 (8). D'autres actualisations portent sur l'ajout de deux méthodes d'essai, utilisant les modèles d'épiderme

humain reconstitué SkinEthic™ RHE¹ et epiCS® (précédemment appelé EST-1000), et sur la possibilité d'utiliser les méthodes pour soutenir la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs.

4. Cette Ligne directrice porte sur quatre méthodes d'essai validées utilisant des modèles d'épiderme humain reconstitué disponibles dans le commerce. Des études de prévalidation (9), suivies d'une étude formelle de validation pour l'évaluation de la corrosion cutanée (10-12), ont été menées (13)(14) (15) sur deux de ces méthodes d'essai disponibles dans le commerce, le modèle standard (SM) EpiSkin™ et l'essai de corrosion cutanée (SCT) EpiDerm™ (EPI-200) (désignées comme les méthodes de référence validées – MRV- dans le texte qui suit). Sur la base des résultats de ces études, il est désormais recommandé que ces deux MRV puissent servir, à des fins réglementaires, à distinguer entre les produits chimiques corrosifs (C) et les produits chimiques non corrosifs (NC), et que la méthode EpiSkin™ puisse également être utilisée pour sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs (15)(16) (17). Deux autres méthodes d'essai d'irritation cutanée *in vitro* sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné des résultats analogues à la MRV EpiDerm™ selon une validation fondée sur les normes de performance (18) (19) (20). Il s'agit des méthodes SkinEthic™ RHE et epiCS® (précédemment connue sous le nom EST-1000), qui peuvent aussi servir à des fins réglementaires pour distinguer les produits chimiques corrosifs des produits chimiques non corrosifs (21) (22). Des études post-validation réalisées entre 2012 et 2014 par les producteurs des modèles d'épiderme humain reconstitué, à l'aide d'un protocole affiné corrigeant les interférences causées par la réduction non spécifique du MTT par les produits chimiques testés, ont amélioré les performances, s'agissant aussi bien de la distinction entre produits chimiques corrosifs et non corrosifs que pour soutenir la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs (23)(24).

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai *in vitro* de corrosivité cutanée sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée autre que les MRV, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, afin de s'assurer de sa similitude avec les MRV, conformément aux normes de performance figurant dans la présente Ligne directrice (annexe 1). L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie qu'après examen et intégration à cette Ligne directrice de toute méthode d'essai nouvelle ou actualisée proposée, conformément aux normes de performance de cette LD. Les méthodes d'essai figurant dans la présente Ligne directrice peuvent s'utiliser pour répondre aux exigences des pays en matière d'essais *in vitro* de corrosivité cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données.

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'annexe 2.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. La présente Ligne directrice se rapporte au volet « corrosion cutanée *in vitro* » de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux recommandée dans la LD 404 pour l'évaluation de la corrosion/irritation cutanée (2) (25). Elle permet d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1). Cette Ligne directrice autorise en outre à sous-catégoriser les substances et mélanges corrosifs, en les classant dans la sous-catégorie facultative 1A telles que définies par le SGH de l'ONU (1), ou dans les sous-catégories 1B et 1C combinées (23)(24). Une limite de cette Ligne

¹L'abréviation RhE (*Reconstructed human Epidermis*) est utilisée en anglais pour désigner tous les modèles basés sur les technologies d'épiderme humain reconstitué. L'abréviation RHE utilisée en lien avec le modèle SkinEthic a la même signification mais, dans le nom de cette méthode d'essai spécifique commercialisée, elle s'écrit intégralement en capitales.

directrice est qu'elle ne permet pas d'établir de distinction entre les sous-catégories de corrosivité cutanée 1B et 1C du SGH de l'ONU (1), en raison du nombre limité de produits chimiques corrosifs *in vivo* de catégorie 1C bien connus. Les méthodes d'essai EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS® sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives (NC)), mais des différences sont constatées en la matière entre EpiSkin™ et les trois autres méthodes d'essai, EpiDerm™, SkinEthic™, epiCS®. Les résultats d'EpiSkin™ peuvent être utilisés tels quels, tandis que ceux d'EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS® présentent des taux élevés de surclassification en 1B et 1C (voir annexe 4). C'est pourquoi, dans les méthodes EpiDerm™ et SkinEthic™ et epiCS®, les produits chimiques classés en 1B et 1C peuvent être considérés comme relevant bien de ces sous-catégories, tandis que les produits chimiques pour lesquels la viabilité cellulaire à 3 minutes est inférieure à 50 % doivent seulement être classés dans la catégorie 1, puisque les prévisions relatives à la sous-catégorie 1A présentent un fort taux de surestimation de produits chimiques qui devraient être classés dans les sous-catégories 1B et 1C. L'utilisation de la présente Ligne directrice sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres, p. ex. en reconnaissant qu'il existe une forte probabilité de surestimation, une classification en sous-catégorie 1A pourrait être acceptée, ou, des tests supplémentaires pourraient être conduits afin de confirmer ce résultat.

8. Un large éventail de produits chimiques, constitué principalement de substances individuelles, a été testé durant l'étude de validation pratiquée en appui des méthodes d'essai proposées dans cette Ligne directrice pour une utilisation à des fins d'identification des substances corrosives et non corrosives ; la base de données empiriques de l'étude de validation totalisait 60 produits chimiques couvrant une grande variété de classes chimiques (10) (11) (12). Les tests visant à démontrer la sensibilité, la spécificité, la précision et la reproductibilité intra-laboratoire de l'essai de sous-catégorisation ont été réalisés par les développeurs de chaque méthode d'essai et leurs résultats ont été examinés par l'OCDE (23) (24). D'après l'ensemble des données disponibles, la Ligne directrice peut être utilisée pour tester un large éventail de classes chimiques et d'états physiques, notamment des liquides, des semi-solides, des solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non ; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application ; aucun autre traitement préalable de l'échantillon n'est nécessaire. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que les méthodes d'essai figurant dans cette Ligne directrice ne peuvent s'appliquer à une catégorie donnée de substances, il convient de ne pas utiliser ces méthodes pour tester la catégorie de substances en question. De plus, outre les substances, cette Ligne directrice est présumée pouvoir s'appliquer aux mélanges. Or, les mélanges couvrant un large éventail de catégories et de compositions, et compte tenu des informations limitées disponibles actuellement dans le domaine public à propos des essais de mélanges, dans les cas où l'on peut apporter la preuve que cette Ligne directrice ne peut s'appliquer à une catégorie donnée de mélanges (par exemple selon la stratégie proposée dans (27)), la LD ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de mélanges en question. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (10) (11) (12). Bien qu'il soit envisageable de tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle Ligne directrice ne permet pas de tester les produits de ce type. Il convient aussi de noter que certains produits chimiques peuvent interférer avec les mesures de la viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger ces interférences (voir les paragraphes 25 à 27).

9. Si la présente LD ne fournit pas d'informations appropriées sur l'irritation cutanée, on notera cependant que la LD 439 porte spécifiquement sur les essais d'irritation cutanée *in vitro* et, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (6). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de suivre la démarche expérimentale séquentielle présentée en supplément à la LD 404 (2) (25). Cette démarche expérimentale prévoit la conduite d'essais *in vitro* de corrosion cutanée (tels que décrits dans la présente Ligne directrice) et d'irritation cutanée avant d'envisager des essais sur des animaux vivants. Il est

entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

10. La présente Ligne directrice comprend également un ensemble de normes de performance (annexe 1) servant à déterminer le degré de validation (fiabilité et pertinence) de méthodes d'essai de corrosion cutanée similaires ou modifiées, semblables structurellement et fonctionnellement aux MRV (7), conformément aux principes du document d'orientation n° 34 (8). Ces normes de performance comprennent une liste de produits chimiques de référence avec lesquels évaluer la performance de l'essai, les éléments essentiels de la méthode d'essai d'après lesquels évaluer la similitude structurelle, fonctionnelle et procédurale de la nouvelle méthode proposée, et les valeurs minimales de fiabilité et de précision nécessaires pour que la méthode d'essai soit considérée comme comparable aux MRV. Parmi la liste de produits chimiques de référence, un sous-ensemble de 13 produits (tableau 1) est fourni afin que les laboratoires fassent la preuve de leur compétence à utiliser des modèles d'épiderme humain *in vitro* (voir paragraphes 13 et 14).

PRINCIPE DE L'ESSAI

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

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

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'une des quatre méthodes validées d'essai sur épiderme humain reconstitué conformes à la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze produits énumérés au tableau 1. S'ils utilisent une méthode de sous-classification, l'exactitude de la sous-catégorisation doit également être démontrée.

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

Produit chimique ¹	Numéro CAS	Classe chimique ²	Cat. SGH de l'ONU d'après les résultats <i>in vivo</i> ³	Cat MVR d'après les résultats <i>in vitro</i> ⁴	Agent réducteur du MTT ⁵	État physique
Substances corrosives <i>in vivo</i> de catégorie 1A						
Acide bromoacétique	79-08-3	acide organique	1A	(3) 1A	--	S.
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	acide inorganique	1A	(3) 1A	--	L.
Phénol	108-95-2	phénol	1A	(3) 1A	--	S.
Chlorure de dichloroacétyle	79-36-7	électrophile	1A	(3) 1A	--	L.
Substances corrosives <i>in vivo</i> de catégorie 1B/1C						
Acide glyoxylique monohydraté	563-96-2	acide organique	1B/1C	(3) 1B/1C	--	S.
Acide lactique	598-82-3	acide organique	1B/1C	(3) 1B/1C	--	L.
Ethanolamine	141-43-5	base organique	1B	(3) 1B/1C	O	V.
Acide chlorhydrique	7647-01-0	acide inorganique	1B/1C	(3) 1B/1C	--	L.
Substances non corrosives <i>in vivo</i>						
Bromure de phénétyle	103-63-9	électrophile	NC	(3) NC	O	L
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	(3) NC	_	S.
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	(3) NC	O	L
Acide laurique	143-07-7	acide organique	NC	(3) NC	_	S.

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

¹Ces substances, d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, puis par classe chimique, ont été choisies parmi les substances utilisées dans les études de validation d'EpiSkinTM et d'EpiDermTM du CEVMA (10) (11) (12) et dans les études post-validation s'appuyant sur les données fournies par les développeurs de EpiSkinTM (24), EpiDermTM, SkinEthicTM et epiCS[®]. Sauf indication contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté qui était le leur lors de l'achat auprès de la source commerciale (10) (12). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui : (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives ; faiblement à fortement corrosives) que les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir ; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation ; (iii) ont une structure chimique bien définie ; (iv) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV ; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence ; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs.

²Classe chimique assignée par Barratt *et al.* (1998) (10).

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

⁴Les prédictions *in vitro* de la MRV ont été obtenues grâce à la méthode d'essai EpiSkinTM et EpiDermTM (MRV) au cours d'essais ultérieurs post-validation réalisés par les développeurs de la méthode d'essai.

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

14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode d'essai a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes d'essai utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

PROCÉDURE

15. Les paragraphes qui suivent offrent une description générique des éléments et des procédures des méthodes d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué traitées dans cette Ligne directrice. Les modèles d'épiderme humain reconstitué considérés comme scientifiquement valides à utiliser dans cette Ligne directrice, à savoir les modèles EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE et epiCS® (18) (19) (20) (28) (29) (30) (31) (32) (33), sont disponibles dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour ces quatre modèles d'épiderme humain reconstitué (34) (35) (36) (37), et les principaux éléments de leur méthode d'essai sont résumés à l'annexe 3. Il est recommandé de consulter le mode opératoire normalisé pertinent lors de la mise en œuvre et de l'utilisation d'une de ces méthodes en laboratoire. Les essais réalisés avec les quatre méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué figurant dans cette Ligne directrice doivent respecter les éléments suivants :

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

Conditions générales

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

Conditions fonctionnelles

Viabilité

17. La viabilité est mesurée au moyen du colorant MTT (27). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent faire en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le contrôle négatif. La densité optique (DO) du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire < 0.1. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les quatre méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué validées figurant dans cette Ligne directrice sont indiquées dans le tableau 2. Il est démontré que les tissus traités par le contrôle

négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de DO similaires) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2 : Plages d'acceptabilité pour la DO du contrôle négatif pour contrôler la qualité du lot

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

Fonction de barrière

18. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de certains produits chimiques marqueurs cytotoxiques tels que le SDS ou le Triton X-100, cette capacité étant évaluée par la CI₅₀ et le TE₅₀ (voir paragraphe 21).

Morphologie

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

Reproductibilité

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

Contrôle de qualité

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

Tableau 3 : Critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM) (18 heures de traitement par SDS) (35)	CI ₅₀ = 1.0 mg/mL	CI ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (Triton X-100 à 1 %)(36)	TE ₅₀ = 4.0 heures	TE ₅₀ = 8.7 heures
SkinEthic™ RHE (Triton X-100 à 1 %)(37)	TE ₅₀ = 4.0 heures	TE ₅₀ = 10.0 heures
epiCS® (Triton X-100 à 1 %)(38)	TE ₅₀ = 2.0 heures	TE ₅₀ = 7.0 heures

Application des substances d'essai et de contrôle

22. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par période d'exposition pour chaque produit chimique testé et substance de contrôle. Pour les produits chimiques liquides comme pour les produits chimiques solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produits chimiques pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum 70 µL/cm² ou 30 mg/cm². Selon les méthodes, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application de produits chimiques solides, afin d'assurer un bon contact entre le produit chimique et la surface de l'épiderme (34) (35) (36) (37). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. La méthode d'application doit convenir au produit chimique testé (voir par exemple les références 12 et 35 à 38). À la fin de la période d'exposition, l'épiderme doit être nettoyé avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0.9 %. En fonction de la méthode validée utilisée, deux ou trois périodes d'exposition sont nécessaires par produits chimiques testés (pour les quatre modèles validés d'épiderme humain reconstitué : 3 min et 1 heure ; pour EpiSkin™, une période d'exposition supplémentaire de 4 heures). Selon la méthode d'essai utilisée et la période d'exposition évaluée, la température d'incubation peut varier entre la température ambiante et 37°C.

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

Mesures de la viabilité cellulaire

24. Il convient de recourir au test MTT, qui est un essai quantitatif, pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette Ligne directrice (28). L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (0.3 ou 1 mg/mL) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (par exemple isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la

concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ± 30 nm au maximum.

25. Les produits chimiques testés sont susceptibles d'interférer avec le test MTT, par réduction directe du MTT en formazan bleu, et/ou par interférence de couleurs si la substance d'essai absorbe, naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de densité optique que le formazan (570 ± 30 nm, produits chimiques principalement bleus et violets). Des contrôles supplémentaires doivent être utilisés pour détecter et corriger les interférences potentielles avec ces produits chimiques testés (voir paragraphes 26 et 27). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique testé n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme, et est donc présent dans les tissus lors de l'essai de viabilité au MTT. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des méthodes d'essai (34) (35) (36) (37). Une réduction non spécifique du MTT et une coloration non spécifique due à ces interférences peuvent porter la densité optique de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre. Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre, par exemple à l'aide de MTT formazan (CAS # 57360-69-7) disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Sigma (réf : M2003), avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires. Quand la DO de l'extrait tissulaire excède la plage de linéarité du spectrophotomètre, il convient de diluer l'extrait dans de l'isopropanol acide ou acidifié et de tenir compte du facteur de dilution lors de l'établissement du pourcentage de réduction non spécifique du MTT et/ou du pourcentage de coloration non spécifique par rapport aux contrôles négatifs effectués en parallèle. Les résultats d'essai obtenus pour les substances présentant un pourcentage de réduction non spécifique du MTT et/ou de coloration non spécifique ≥ 50 % par rapport au contrôle négatif doivent être considérés avec précaution.

26. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique testé à un milieu MTT fraîchement préparé. On incube le mélange dans l'obscurité à 37°C , sous atmosphère de CO_2 à 5 %, pendant au minimum 60 minutes et au maximum 180 minutes selon le modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (34) (35) (36) (37). Le milieu MTT est utilisé comme témoin. Si le mélange contenant le produit chimique testé (ou la suspension d'essai pour les composés insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique testé est un réducteur direct du MTT ; il convient alors de réaliser une autre vérification fonctionnelle sur de l'épiderme non viable. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent aucune activité métabolique, mais absorbent et se lient au produit chimique testé dans des proportions similaires aux tissus viables. Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux répliquats de tissus morts par temps d'exposition, sur lesquels on pratique l'ensemble de l'essai de corrosion cutanée. La viabilité réelle du tissu s'obtient en calculant la différence entre la DO obtenue sur le tissu vivant traité par l'agent réducteur de MTT et la DO obtenue sur le tissu congelé traité à l'aide du réducteur de MTT, divisée par la DO du contrôle négatif testé en parallèle.

27. Afin d'identifier les interférences de couleur, il convient de procéder à l'analyse spectrale d'un produit chimique coloré dans l'eau (environnement d'exposition) et/ou l'isopropanol (solution d'extraction) pour évaluer si ce produit nécessite l'utilisation de témoins supplémentaires. Si le produit chimique dans l'eau et/ou l'isopropanol absorbe la lumière dans la plage de 570 ± 30 nm, il convient de recourir à des témoins de coloration. Chaque produit chimique coloré est appliqué sur au moins deux répliquats de tissus viables par période d'exposition, sur lesquels on pratique l'ensemble de l'essai de corrosion cutanée, mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation. Il convient d'effectuer un contrôle de coloration non spécifique indépendant pour chaque produit chimique testé coloré, parallèlement à chaque période d'exposition (pour chaque épreuve), en raison de la variabilité biologique inhérente des tissus vivants. La viabilité réelle du tissu s'obtient en

calculant la différence entre la DO obtenue sur les tissus vivants incubés dans la solution MTT et la DO obtenue sur les tissus vivants incubés dans le milieu sans MTT, divisée ensuite par la DO du contrôle négatif testé dans la même épreuve.

Critères d'acceptabilité

28. Pour chaque méthode d'essai recourant à des modèles d'épiderme humain reconstitué valides, les tissus traités par le contrôle négatif présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus qui respecte les plages d'acceptabilité du tableau 2 et qui ne doit pas être inférieure aux limites historiques. Les résultats obtenus pour les tissus traités par le contrôle positif, c'est-à-dire l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N, doivent montrer leur capacité à réagir à un produit chimique corrosif dans les conditions de la méthode d'essai (voir [annexe 3](#)). La variabilité entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques testés et/ou substances de contrôle doit se situer dans la plage acceptable pour chaque modèle validé d'épiderme humain reconstitué (voir [annexe 3](#)) (par exemple la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %). Si le contrôle négatif ou positif inclus dans une épreuve sort de la plage d'acceptabilité, l'épreuve est considérée comme non qualifiée et doit être répétée. Si la variabilité des produits chimiques testés sort de la plage des valeurs admissibles, l'essai doit être répété.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

29. Les valeurs de DO obtenues pour chaque produit chimique testé doivent servir à calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif, dont la DO est fixée à 100 %. Les valeurs seuils du pourcentage de viabilité cellulaire qui établissent la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre les différentes sous-catégories de substances corrosives) sont définies ci-dessous aux paragraphes 31 et 32 pour chacune des méthodes d'essai traitées dans la présente Ligne directrice et doivent être utilisées pour interpréter les résultats.

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

31. Le tableau 4 présente le modèle prédictif de la méthode d'essai de corrosion cutanée EpiSkin™ (11) (24) (34), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU (1) :

Tableau 4 : Modèle prédictif d'EpiSkin™

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

*) D'après les données produites pour évaluer l'utilité des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué à des fins de sous-catégorisation, environ 22 % des résultats de la méthode d'essai EpiSkin™ relevant de la catégorie 1A pourraient en fait constituer des substances/mélanges de catégorie 1B ou 1C (surclassification) (voir le tableau 4.0 de l'annexe 4).

32. Le tableau 5 présente les modèles prédictifs des méthodes d'essai de corrosion cutanée EpiDerm™ SCT (13) (36), SkinEthic™ RHE (19) (20) (36) et epiCS® (18) (37), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU (1) :

Tableau 5 : EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS®

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60 minutes)	Prévision à considérer
< 50 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : • Sous-catégorie facultative 1A **
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET < 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : • Combinaison de sous-catégories facultatives 1B et 1C
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET ≥ 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique non corrosif

*) D'après les données produites pour évaluer l'utilité des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué à des fins de sous-catégorisation, environ 42 % des résultats de la méthode d'essai EpiDerm™ relevant de la catégorie 1A et environ 46 % des résultats de la méthode d'essai SkinEthic™ et epiCS® relevant de la catégorie 1A pourraient en fait constituer des substances/mélanges de catégorie 1B ou 1C (surclassification) (voir le tableau 4.0 de l'annexe 4).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

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

Rapport d'essai

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

Produits chimique testé et substances de contrôle :

- nom(s) de la substance/produit chimique, tels que le nom et le cas échéant le numéro IUPAC ou CAS ;
- pureté et composition de la substance ou du mélange (en pourcentage(s) par unité de 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 des produits chimiques testés et substances de contrôle avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre) ;
- conditions de stockage.

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), passe-bande utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire et plage de linéarité en DO de cet appareil de mesure ;
- 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 capacité prédictive ;
 - v) contrôles de qualité (CQ) du modèle ;
- détails du protocole utilisé, à savoir (liste non limitative) :
 - i) procédures de lavage utilisées après la période d'exposition ;
 - ii) longueur d'onde et passe-bande (filtre) utilisés pour mesurer la DO (viabilité cellulaire)
- doses d'essai utilisées, durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition ;
- 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), par temps d'exposition ;
- contrôles utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques testés colorés ;
- description de toute modification du protocole (y compris les procédures de lavage) ;
- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative) :
 - i) acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques ;
 - ii) acceptabilité des valeurs des contrôle positifs et négatifs par rapport aux moyennes et aux plages de variation des contrôles positifs et négatifs ;
 - iii) acceptabilité des résultats d'essai par rapport à la variabilité historique entre réplicats de tissus ;
- description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé.

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, moyennes, plages de variation et coefficients de variation, classification résultante ;

- résultats des contrôles utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques testés colorants ;
- description de tous autres effets observés ;
- classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (ONU) (2013), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies, cinquième édition révisée, ONU New York et Genève. Disponible à l'adresse : http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html.
- (2) OCDE (2002), *Essai n° 404: Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070639-fr>.
- (3) OCDE (2004), *Essai n° 431 : Corrosion cutanée in vitro : Essai sur modèle de peau humaine*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071155-fr>.
- (4) OCDE (2004), *Essai n° 430 : Corrosion cutanée in vitro : Essai de résistance électrique transcutanée (TER)*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071131-fr>.
- (5) OCDE (2006), *Essai n° 435 : Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264067325-fr>.
- (6) OCDE (2010), *Essai n° 439 : Irritation cutanée in vitro : essai sur épiderme humain reconstitué*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264090965-fr>.
- (7) ICCVAM (2004), *Recommended Performance Standards for In Vitro Test Methods for Skin Corrosion*. NIH Publication Number 04-4510. Research Triangle Park, NC, National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse : http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/dermal_docs/ps044510.pdf.
- (8) 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, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse : [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) Botham, P.A. et al. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 6, *ATLA*, Vol. 23, pp. 219-255.
- (10) Barratt, M.D. et al. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro*, Vol. 12/4, pp. 471-482.
- (11) Fentem, J.H. et al. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro*, 12/4, pp. 483-524.

- (12) Liebsch, M. et al. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing, *ATLA*, Vol. 28, pp. 371-401.
- (13) Balls, M. et al. (1995), Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops, *ATLA*, Vol. 23, pp. 129-147.
- (14) ICCVAM (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives) (1997), *Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods*. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis. Disponible à l'adresse : [<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>].
- (15) ICCVAM (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives) (2002), *ICCVAM evaluation of EpiDermTM (EPI-200), EPISKINTM (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals*. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis. Disponible à l'adresse : [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf]
- (16) CE-CEVMA (1998), *Statement on the scientific validity of the EpiSkinTM test (an in vitro test for skin corrosivity)*, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC10), 3 avril 1998. Disponible à l'adresse : [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (17) CE-CEVMA (2000), *Statement on the application of the EpiDermTM human skin model for skin corrosivity testing*, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC14), 21 mars 2000. Disponible à l'adresse : [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (18) Hoffmann, J. et al. (2005), Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000)-A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing, *Toxicology in Vitro*, Vol. 19/7, pp. 925-929.
- (19) Kandárová, H. et al. (2006), Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for *in vitro* skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, *Toxicology in Vitro*, Vol. 20/5, pp. 547-559.
- (20) Tornier, C., M. Roquet, A.B. Fraissinette (2010), Adaptation of the validated SkinEthicTM Reconstructed Human Epidermis (RHE) skin corrosion test method to 0.5 cm² tissue sample, *Toxicology in Vitro*, Vol. 24/5, pp. 1379-1385.
- (21) CE-CEVMA (2006), *Statement on the application of the SkinEthicTM human skin model for skin corrosivity testing*, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC25), 17 novembre 2006. Disponible à l'adresse : [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (22) CE-CEVMA (2009), *ESAC statement on the scientific validity of an in-vitro test method for skin corrosivity testing: the EST-1000*, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC30), 12 juin 2009. Disponible à l'adresse : [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
- (23) OECD (2013), "Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 190, OECD Publications, Paris.

- (24) Alépée, N., M.H. Grandidier, J. Cotovio (2014), Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431, *Toxicology in Vitro*, Vol. 28/2, pp. 131-145.
- (25) Worth, A.P. et al. (1998), An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion, *ATLA*, Vol. 26, pp. 709-720.
- (26) Eskes, C. et al. (2012), Regulatory assessment of *in vitro* skin corrosion and irritation data within the European framework: Workshop recommendations, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 62/2, pp. 393-403.
- (27) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 65/1, pp. 55-63.
- (28) Tinois, E. et al. (1994), The Episkin model: Successful reconstruction of human *epidermis in vitro*, in *In vitro Skin Toxicology*, Rougier, A., A.M. Goldberg, H.I. Maibach (eds.), Mary Ann Liebert, Inc., pp. 133-140.
- (29) Cannon, C. L. et al. (1994), New epidermal model for dermal irritancy testing, *Toxicology in Vitro*, Vol. 8/4, pp. 889 - 891.
- (30) Ponec, M. et al. (2000), Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 203/1-2, pp. 211 - 225.
- (31) Tinois, E. et al. (1991), *In vitro* and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute, *Experimental Cell Research*, Vol. 193/2, pp. 310-319.
- (32) Parenteau, N.L. et al. (1992), The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function, *Cytotechnology*, Vol. 9, pp. 163-171.
- (33) Wilkins, L.M. et al. (1994), Development of a bilayered living skin construct for clinical applications, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43/8, pp. 47-756.
- (34) EpiSkin™ SOP, protocole *INVITTOX* n° 118 (décembre 2011), *EpiSkin™ Skin Corrosivity Test*. Disponible à l'adresse : <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (35) EpiDerm™ SOP, version MK-24-007-0024 (février 2012), protocole sur : *In vitro EpiDerm™ skin corrosion test (EPI-200-SCT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm*. Disponible à l'adresse : <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP, protocole *INVITTOX* (janvier 2012), *SkinEthic™ Skin Corrosivity Test*. Disponible à l'adresse : <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (37) epiCS® SOP, version 4.1 (janvier 2012), *In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems*. Disponible à l'adresse : <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.

ANNEXE 1

NORMES DE PERFORMANCE POUR L'ÉVALUATION DE MÉTHODES SIMILAIRES OU MODIFIÉES PROPOSÉES POUR LES ESSAIS DE CORROSION CUTANÉE *IN VITRO* SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ²**INTRODUCTION**

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la fiabilité et la pertinence de méthodes d'essai nouvelles ou modifiées vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées ou non (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement). Conçues à partir de méthodes d'essai validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la fiabilité et la pertinence d'autres méthodes d'essai analogues fondées sur des principes scientifiques similaires et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (8). En outre, il convient d'évaluer les méthodes modifiées, qui proposent des améliorations à une méthode d'essai approuvée, afin 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 une nouvelle méthode d'essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (9).

2. La fiabilité et la pertinence des méthodes d'essai similaires ou des variantes des méthodes d'essai proposées dans la présente Ligne directrice sont évaluées à l'aide de produits chimiques de référence (tableau 1) représentant l'éventail complet des scores de corrosivité *in vivo* de la LD 404, autrement dit des substances chimiques corrosives (SGH de l'ONU, catégorie 1A et catégories 1B et 1C) et des substances chimiques non corrosives (1). Les valeurs de fiabilité et de capacité prédictive obtenues lors de l'évaluation des méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées doivent être comparables à celles obtenues par les deux MRV [EpiSkinTM (SM) et EpiDermTM SCT (EPI-200)] ou meilleures que celles-ci et telles que décrites aux paragraphes 6 à 10 de la présente annexe (tableaux 2 et 3) (11) (12) (24). Avant d'appliquer une méthode d'essai nouvelle ou modifiée pour tester des produits chimiques, il convient de déterminer sa fiabilité et son aptitude à détecter correctement les substances chimiques corrosives et non corrosives, et si possible à distinguer entre les substances chimiques corrosives de catégorie 1A, d'une part, et de catégorie 1B et 1C, d'autre part.

3. Ces normes de performance sont fondées sur celles de l'ICCVAM (États-Unis) (7) pour l'évaluation de la validité de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué nouvelles ou modifiées. Elles comprennent (8) : (i) les éléments essentiels des méthodes d'essai ; (ii) les produits chimiques de référence recommandés, et ; (iii) les valeurs définies que la fiabilité et la précision de la méthode d'essai proposée devraient atteindre ou dépasser.

LES ÉLÉMENTS ESSENTIELS DE LA MÉTHODE D'ESSAI

4. 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,

² Les propositions de méthodes d'essai nouvelles ou modifiées conformes aux normes de performance de la présente Ligne directrice doivent être soumises à l'OCDE pour adoption et intégration à la LD avant d'être utilisées à des fins réglementaires.

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 MRV correspondantes (6). Les éléments essentiels de la méthode d'essai sont décrits en détail aux paragraphes 16 à 32 de la présente Ligne directrice :

Conditions générales (paragraphe 16)

Conditions fonctionnelles, comprenant :

- viabilité (paragraphe 17) ;
- fonction de barrière (paragraphe 18) ;
- morphologie (paragraphe 19) ;
- reproductibilité (paragraphe 20)
- contrôle de qualité (paragraphe 21)

Conditions procédurales (paragraphes 22 à 32)

S'agissant des paramètres spécifiques (par exemple tableaux 2, 3, 4, 5 et 6), il convient de fournir les valeurs adéquates pour toute nouvelle méthode d'essai similaire ou modifiée ; ces valeurs spécifiques peuvent varier en fonction de la méthode d'essai.

LISTE MINIMALE DE PRODUITS CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

5. Les produits chimiques de référence sont utilisés pour déterminer si la fiabilité et la pertinence d'une méthode d'essai proposée similaire ou modifiée, dont on a démontré qu'elle était suffisamment semblable aux MRV sur les plans structurel et fonctionnel, ou apportait des changements mineurs par rapport à l'une des MRV, sont comparables à celles des MRV ou meilleures que celles-ci (11) (12) (24). Les 30 produits chimiques de référence recommandés figurant dans le tableau 1 comprennent des substances représentant différentes classes chimiques (catégories chimiques basées sur des groupes fonctionnels) et représentatives de l'éventail complet des scores *in vivo* de la LD 404. Cette liste comprend 10 substances appartenant à la catégorie 1A du SGH de l'ONU, 10 appartenant aux catégories 1B et 1C du SGH de l'ONU (les données *in vivo* ne permettant pas d'établir la distinction entre ces deux catégories) et 10 substances non corrosives. Les substances figurant dans le tableau 1 sont sélectionnées parmi celles utilisées lors de l'étude de validation des MRV, eu égard à leur fonction chimique et leur état physique (10) (11) (12) (24). Ces produits chimiques de référence représentent le nombre minimal de substances à utiliser pour évaluer la fiabilité et la pertinence d'une méthode d'essai similaire ou modifiée proposée, capable de distinguer entre les substances et mélanges de catégorie 1 A, de catégorie 1B et 1C et les substances non corrosives (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives) selon la définition du SGH de l'ONU (1). En ce qui concerne les méthodes d'essai similaires ou modifiées capables d'établir la distinction entre substances et mélanges corrosifs et non corrosifs, mais non de sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs, seules 20 des 30 substances énumérées au tableau 1 (celles qui ne sont pas en italiques) doivent être évaluées (5 de la catégorie 1A du SGH de l'ONU, 5 des catégories 1B et 1C du SGH de l'ONU et 10 substances non corrosives). Dans la mesure du possible on évitera de recourir à ces produits chimiques de référence pour développer/optimiser de nouvelles méthodes d'essai similaires. Si une substance du tableau n'est pas disponible, on pourra utiliser d'autres substances pour lesquelles il existe des données de référence *in vivo* appropriées, choisies en premier lieu parmi celles utilisées lors de l'étude de validation des MRV. Si nécessaire, il est possible d'ajouter à cette liste minimale d'autres substances représentant d'autres classes chimiques et pour lesquelles on dispose de données de référence *in vivo* appropriées, afin d'évaluer plus avant la précision de la méthode d'essai proposée.

Tableau 1 : Liste minimale de produits chimiques de référence pour la détermination des valeurs de fiabilité et de capacité prédictive de méthodes similaires ou modifiées d'essai de corrosion cutanée *in vitro* sur épiderme humain reconstitué. Les 20 produits chimiques qui ne sont PAS *en italiques* doivent être testés à l'aide de méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées pour distinguer les produits chimiques corrosifs des produits non corrosifs (sans sous-catégorisation). Les produits de référence supplémentaires, indiqués *en italiques*, doivent être testés à l'aide de méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées en vue d'identifier les produits chimiques de catégorie 1A, les produits chimiques appartenant à une combinaison des catégories 1B et 1C et les produits non corrosifs (sous-catégorisation).

Produit chimique ¹	Numéro CAS	Classe chimique ²	État physique	EpiSkin ^{TM4}	EpiDerm ^{TM4}	SkinEthic ^{TM4}	epiCS® ⁴
Catégorie « Non corrosif » (NC) du SGH de l'ONU d'après les résultats <i>in vivo</i>³							
Bromure de phénéthyle*	103-63-9	Electrophile	L	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	Base organique	S	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
4-(méthylthio)-benzaldéhyde*	3446-89-7	Electrophile	L	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
Acide laurique	143-07-7	Acide organique	S	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
1,9-décadiène	1647-16-1	Organic neutre	L	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
Diméthyle aniline	95-68-1	Base organique	L	(2) NC (1) 1B/1C	(1) NC (2) 1B/1C	(1) 1A (2) 1B/1C	(1) NC (1) 1B/1C
Acide 3,3-dithiopropionique	1119-62-6	Base organique	S	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
Palmitate de méthyle	112-39-0	Organique neutre	S	(3) NC	(3) NC	(3) NC	(2) NC
Acide 2-hydroxyisobutyrique	594-61-6	Acide organique	S	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
Undécylénate de sodium (33 %)	3398-33-2	Savon/tensioactif	L	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
Catégories 1B et 1C du SGH de l'ONU d'après les résultats <i>in vivo</i>³							
Acide glyoxylique monohydraté	563-96-2	Acide organique	S	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
Acide lactique	598-82-3	Acide organique	L	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
Bisulfate de sodium monohydraté	10034-88-5	Sel inorganique	S	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C (1) NC	(2) 1B/1C
Éthanolamine*	141-43-5	Base organique	visqueux	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C
<i>Acide octanoïque/décanoïque 60/40</i>	<i>68937-75-7</i>	<i>Acide organique</i>	<i>L</i>	<i>(3) 1B/1C</i>	<i>(3) 1B et 1C</i>	<i>(3) 1B/1C</i>	<i>(2) 1B/1C</i>
<i>Acide hydrochlorique</i>	<i>7647-01-0</i>	<i>Acide inorganique</i>	<i>L</i>	<i>(3) 1B/1C</i>	<i>(3) 1B et 1C</i>	<i>(3) 1B/1C</i>	<i>(2) 1B/1C</i>

(14,4 %)							
Acide fluoborique	16872-11-0	Acide inorganique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Acide propionique	79-09-4	Acide organique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
2-tert-butylphénol*	88-18-6	Phénol	L	(3) 1B/1C	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Cyclohexylamine*	108-91-8	Base organique	L	(3) 1B/1C	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Catégorie 1A du SGH de l'ONU d'après les résultats <i>in vivo</i>³							
Acide acrylique	79-10-7	Acide organique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Acide bromoacétique	79-08-3	Acide organique	S	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	Acide inorganique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Phénol	108-95-2	Phénol	S	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Tribromure de phosphore	7789-60-8	Acide inorganique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Nitrate d'argent	7761-88-8	Sel inorganique	S	(1) 1A (2) 1B/1C	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Acide formique	64-18-6	Acide organique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Chlorure de dichloroacétyle	79-36-7	Electrophile	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
Acide sulfurique (98 %)	7664-93-9	Acide inorganique	L	(3) 1A	(3) 1A	(3) 1A	(2) 1A
N,N-Diméthylidipropylène triamine*	10563-29-8	Base organique	L	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(3) 1B/1C	(2) 1B/1C

Abréviations : CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service ; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (1) ; NC : Non Corrosif

¹ Ces substances, d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, ont été choisies parmi les substances utilisées dans les études de validation d'EpiSkin™ et d'EpiDerm™ du CEVMA (10-12) et dans les études post-validation s'appuyant sur les données fournies par les développeurs d'EpiSkin™ (24), EpiDerm™, SkinEthic™ and epiCS®. Sauf indication contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté qui était le leur lors de l'achat auprès de la source commerciale (10)(12). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui : (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives ; faiblement à fortement corrosives) que les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir ; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation ; (iii) reflètent les caractéristiques de performance de la MRV ; (iv) ont une structure chimique bien définie ; (v) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV ; (vi) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence ; (vii) sont disponibles dans le commerce et (viii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs. Les substances chimiques marquées par un astérisque (*) sont des réducteurs directs du MTT potentiels.

² Classe chimique établie par Baratt *et al.* (1998) (10).

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

⁴ Les prédictions *in vitro* reportées dans ce tableau ont été obtenues grâce à différentes méthodes d'essai au cours d'études post-validation réalisées par les développeurs des méthodes d'essai. Ces prédictions ont été corrigées pour la réduction directe du MTT au moyen de tissus témoins morts.

VALEURS DÉFINIES DE FIABILITÉ ET DE PRÉCISION

6. Afin d'établir la fiabilité et la pertinence des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées proposées pour être utilisées par plusieurs laboratoires indépendants, les 30 produits chimiques de référence du tableau 1 sont testés dans au moins trois laboratoires différents (24 produits chimiques de référence pour les méthodes qui ne sont pas capables de sous-catégoriser les substances corrosives). Il est toutefois essentiel que toutes les études de validation fondées sur les normes de performance soient évaluées de manière indépendante par des organismes de validation reconnus au niveau international, conformément au document d'orientation en la matière (8). Dans chaque laboratoire, tous les produits chimiques de référence pertinents doivent être testés pour chaque durée d'exposition au cours de trois épreuves indépendantes réalisées sur des lots de tissus différents et à des intervalles de temps suffisamment espacés. Chaque épreuve doit comprendre au moins deux répliqués de tissus testés en parallèle, pour chaque temps d'exposition et pour chaque produit chimique testé, contrôle négatif, contrôle positif et autres témoins ou contrôle adaptés permettant d'évaluer la réduction directe du MTT et/ou les interférences de couleur.

7. Le calcul des valeurs de la fiabilité et de capacité prédictive de la méthode d'essai proposée doit s'effectuer conformément aux règles décrites ci-après, afin de garantir la mise en œuvre d'une approche prédéfinie et cohérente :

1. La reproductibilité intra-laboratoire se calcule en fonction de la concordance des classifications, uniquement à l'aide d'essais qualifiés réalisés avec les produits chimiques de référence pour lesquels au moins deux essais qualifiés sont disponibles. Il convient en outre de consigner le nombre et l'identité des produits chimiques de référence pour lesquels chaque laboratoire ne présente qu'un seul essai qualifié ou n'en présente aucun (et qui sont exclus des calculs de reproductibilité intra-laboratoire), ainsi que le nombre et l'identité des produits chimiques de référence pour lesquels chaque laboratoire présente deux ou trois essais qualifiés (pris en compte dans les calculs de reproductibilité intra-laboratoire).
2. Pour le calcul de la reproductibilité inter-laboratoires, la classification finale de chaque produit chimique de référence dans chaque laboratoire participant s'obtient en utilisant la valeur de fiabilité moyenne des différents essais qualifiés réalisés. La reproductibilité inter-laboratoires se calcule en fonction de la concordance des classifications, uniquement à l'aide des essais qualifiés réalisés avec les produits chimiques de référence pour lesquels au moins un essai qualifié est disponible par laboratoire. Il convient de consigner le nombre et l'identité des produits chimiques pour lesquels chaque laboratoire ne présente pas au moins un essai qualifié (et qui sont exclus des calculs de reproductibilité inter-laboratoires), ainsi que le nombre et l'identité des produits chimiques de référence pour lesquels on dispose de 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 essais qualifiés pouvant servir à calculer la reproductibilité inter-laboratoires (avec au moins un essai qualifié par laboratoire).
3. Le calcul des valeurs prédictives (p.ex. sensibilité, spécificité et précision par C versus NC) doit s'effectuer à l'aide de tous les essais qualifiés réalisés avec chaque produit chimique de référence dans chaque laboratoire. Les calculs doivent s'appuyer sur les prédictions individuelles de chaque essai qualifié, pour chaque produit de référence et chaque laboratoire, et non sur la moyenne des valeurs de viabilité obtenues pour les différents essais qualifiés.

Dans ce contexte, on entend par essai **qualifié** un essai qui remplit les critères d'acceptabilité définis dans le mode opératoire normalisé correspondant, et s'inscrit dans une épreuve qualifiée. Dans le cas contraire, l'essai est considéré comme non qualifié. Une **épreuve qualifiée** est une épreuve qui remplit les critères d'acceptabilité définis dans le mode opératoire normalisé concernant le contrôle négatif et le contrôle positif. Dans le cas contraire, l'épreuve est considérée comme non qualifiée.

Reproductibilité intra-laboratoire

8. L'évaluation de la reproductibilité intra-laboratoire d'une méthode d'essai similaire ou modifiée proposée pour distinguer entre les produits chimiques corrosifs et non corrosifs (mais non pour sous-catégoriser les substances chimiques corrosives) doit faire apparaître une concordance des classifications (substances corrosives ou non corrosives), obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 24 produits chimiques de référence pertinents par un même laboratoire, qui soit supérieure ou égale (\geq) à 90 % (concordance réelle pour EpiSkinTM : 100 %, 100 % et 96 % pour chaque laboratoire respectivement). L'évaluation de la reproductibilité intra-laboratoire d'une méthode d'essai similaire ou modifiée proposée pour distinguer entre les substances chimiques de catégorie 1A, de catégorie 1B et 1C et les substances chimiques non corrosives doit faire apparaître une concordance des classifications (catégorie 1A, catégories 1B et 1C ou substances non corrosives), obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 30 produits chimiques de référence au sein d'un seul laboratoire, qui soit supérieure ou égale (\geq) à 80 % (concordance réelle pour EpiSkinTM : 96 %, 96 % et 88 % pour chaque laboratoire respectivement).

Reproductibilité inter-laboratoires

9. Pour les méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées afin de distinguer entre les substances chimiques corrosives et non corrosives (mais non de sous-catégoriser les substances chimiques corrosives), la concordance des classifications (substances corrosives ou non corrosives), obtenues dans au moins trois laboratoires pour les 24 produits chimiques de référence pertinents, doit être supérieure ou égale (\geq) à 80 % (concordance réelle pour EpiSkinTM : 88 %). Pour les méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées afin de distinguer entre les substances chimiques de catégorie 1A, de catégorie 1B et 1C et les substances chimiques non corrosives, la concordance des classifications (catégorie 1A, catégories 1B et 1C ou substances non corrosives), obtenues dans au moins trois laboratoires pour les 30 produits chimiques de référence, doit être supérieure ou égale (\geq) à 70 % (concordance réelle pour EpiSkinTM : 80 %).

Valeur prédictive

10. La valeur prédictive de la méthode d'essai similaire ou modifiée proposée doivent être comparables ou supérieures à celle des MRV. Pour les méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées afin de distinguer entre les substances chimiques corrosives et non corrosives, mais non de sous-catégoriser les substances chimiques corrosives, la sensibilité et la spécificité obtenues pour les 20 produits chimiques de référence pertinents (tableau 1) doivent être supérieures ou égales (\geq) à 95 % et 70 % respectivement, tandis que la précision doit être supérieure ou égale (\geq) à 82.5 % (tableau 2). Pour les méthodes d'essai similaires ou modifiées proposées afin de distinguer entre les substances chimiques de catégorie 1A, de catégorie 1B et 1C et les substances chimiques non corrosives (cat. 1A vs cat. 1B et 1C vs substances non corrosives), les valeurs prédictives minimales à obtenir avec les 30 produits chimiques de référence (tableau 1) sont indiquées au tableau 3 pour les méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires à EpiSkinTM et pour les méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires à EpiDermTM.

Tableau 2 : Valeurs de sensibilité, de spécificité et de précision nécessaires pour que des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées soient considérées comme valables afin de distinguer entre les substances chimiques corrosives et non corrosives mais non de sous-catégoriser les produits corrosifs. Les valeurs sont fondées sur les résultats des deux MVR (EpiSkinTM et EpiDermTM) pour les 20 produits chimiques de référence qui ne sont pas marquées en italique dans le Tableau 1.

Sensibilité	Spécificité	Précision
<p>≥ 95 %</p> <p>(valeur réelle pour EpiSkinTM: 100% ; valeur réelle pour EpiDermTM :100%)</p>	<p>≥ 70 %</p> <p>(valeur réelle pour EpiSkinTM : 76.7% ; valeur réelle pour EpiDermTM : 73.3%)</p>	<p>≥ 82.5 %</p> <p>(valeur réelle pour EpiSkinTM, : 88.3% ; valeur réelle pour EpiDermTM : 86.7 %)</p>

Tableau 3 : Valeurs prédictives nécessaires pour que des méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées soient considérées comme valables afin de distinguer entre les substances chimiques de catégorie 1A, une combinaison de catégories 1B et 1C et les substances chimiques non corrosives (cat. 1A vs cat. 1B et 1C vs substances non corrosives)*. Ces valeurs sont fondées sur des calculs réalisés sur les résultats des deux méthodes validées de référence (MVR) (EpiSkin™ et EpiDerm™) pour les 30 produits chimiques de référence (voir tableau 1).

VRM	EpiSkin™	EpiDerm™
Sensibilité (substances corrosives vs non corrosives)	≥ 95 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 100.0 %)	≥ 95 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 100.0 %)
Correctement classées en 1A	≥ 80 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 83.3 %)	≥ 90 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 90.0 %)
Substances 1A sous-classées en 1B et 1C	≤ 20 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 16.7 %)	≤ 10 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 10.0 %)
Substances 1A sous-classées comme non corrosives	≤ 0 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 0.0 %)	≤ 0 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 0.0 %)
Correctement classées 1B et 1C	≥ 80 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 80.0 %)	≥ 55 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 60.0 %)
Substances 1B et 1C sous-classées en 1A	≤ 20 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 20.0 %)	≤ 45 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 40.0 %)
Substances 1B et 1C sous-classées comme non corrosives	≤ 5 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 0.00 %)	≤ 5 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 0.00 %)
Spécificité	≥ 70 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 76.7 %)	≥ 70 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 73.3 %)
Substances non corrosives surclassées en 1A	≤ 5 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 0.0 %)	≤ 5 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 0.0 %)
Substances non corrosives surclassées en 1B et 1C	≤ 30 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 23.3 %)	≤ 30 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 27.6 %)
Précision (substances corrosives vs non corrosives)	≥ 87 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 92.2 %)	≥ 87 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 91.1 %)
Précision (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives)	≥ 78 % (valeur réelle pour EpiSkin™ : 80.0 %)	≥ 72 % (valeur réelle pour EpiDerm™ : 74.4 %)

* En fonction des résultats obtenus avec une méthode d'essai similaire ou modifiée sur épiderme humain reconstitué pour les 30 substances de référence, la méthode peut être considérée similaire à EpiSkin™ ou similaire à EpiDerm™ dans le cadre de cette Ligne directrice. Les méthodes d'essai EpiSkin™ et EpiDerm™ sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives), mais des différences sont constatées en la matière (SkinEthic™ et epiCS® sont considérées similaires à EpiDerm™). Pour les méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué qui démontrent une similarité à EpiSkin™, les résultats peuvent être directement utilisés sur la base des

prédictions obtenues. Pour les méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué qui démontrent une similarité à EpiDerm™, les produits chimiques classés en 1B et 1C peuvent être considérés comme relevant bien de ces sous-catégories, tandis que les produits chimiques pour lesquels la viabilité cellulaire à 3 minutes est inférieure à 50 % doivent être classés dans la catégorie 1, puisque les prédictions en catégorie 1A de ces trois méthodes d'essai génèrent un fort taux de sur-classification des produits en catégories 1B et 1C (voir paragraphe 7 de la Ligne directrice). L'utilisation de la présente Ligne directrice sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres, p.ex. en reconnaissant la probabilité significative de sur-classification ; une classification en Catégorie 1A peut malgré tout être acceptée, ou sinon d'autres tests pourraient être conduits afin de confirmer la classification.

Critères d'acceptation de l'étude

11. Il est possible qu'un ou plusieurs essai(s) relatif(s) à un ou plusieurs produit chimique(s) testé et substance(s) de contrôle ne remplisse(nt) pas les critères d'acceptation ou qu'il(s) ne soit(en)t pas acceptable(s) pour d'autres raisons (essais non qualifiés). Afin de compléter les données manquantes, deux essais supplémentaires au maximum pour chaque produit chimique testé sont autorisés par laboratoire (nouvel essai). Plus précisément, étant donné qu'en cas de nouvel essai, les contrôles positifs et négatifs doivent aussi être testés simultanément, deux épreuves supplémentaires au maximum peuvent être réalisées pour chaque produit chimique testé dans chaque laboratoire. Il importe que chaque laboratoire ne réalise pas plus de trois essais qualifiés par produit chimique testé. La production excessive de données puis la sélection de ces données sont jugées non appropriées.

12. Il est possible que, même après un nouvel essai, tous les laboratoires participants ne puissent pas réaliser trois essais qualifiés pour tous les produits chimiques de référence et que par, conséquent, la matrice de données obtenue soit incomplète. Dans ce cas, il convient de respecter les trois critères suivants pour pouvoir considérer les jeux de données comme acceptables aux fins d'études de validation fondées sur les normes de performance :

1. tous les produits chimiques de référence pertinents (24 pour distinguer entre la catégorie 1 et les substances non corrosives, 30 pour distinguer entre la catégorie 1A vs les catégories 1B et 1C vs les substances non corrosives) doivent au moins faire l'objet d'une séquence d'essais complète dans un laboratoire.
2. Chacun des laboratoires participants (au moins trois) doit achever au minimum 85 % de ses séquences d'essais (pour 24 produits chimiques de référence, 3 séquences d'essais incomplètes sont autorisées par laboratoire ; pour 30 produits chimiques de référence, 4 séquences d'essais incomplètes sont autorisées par laboratoire).
3. Au minimum 90 % de l'ensemble des séquences d'essais des laboratoires participants (au moins trois) doivent être complètes (pour 24 produits chimiques de référence testés dans 3 laboratoires, 7 séquences d'essais incomplètes sont autorisées au total ; pour 30 produits chimiques testés dans 3 laboratoires, 9 séquences d'essais incomplètes sont autorisées au total).

Dans ce contexte, une **séquence d'essais** correspond au nombre total d'essais indépendants réalisés pour un même produit chimique de référence par un même laboratoire, y compris tous les essais réitérés (soit un total de 3 à 5 essais). Une **séquence d'essais complète** est une séquence d'essais qui comprend trois essais qualifiés. Une séquence d'essais comprenant moins de 3 essais qualifiés est considérée comme incomplète.

ANNEXE 2

DÉFINITIONS

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

Concordance : mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats catégoriels. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de « précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques testés qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de substances mises à l'essai (9).

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

DO : densité optique

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

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

Épreuve qualifiée : épreuve qui remplit les critères d'acceptabilité définis dans le mode opératoire normalisé correspondant en ce qui concerne les contrôles négatif et positif. Dans le cas contraire, l'épreuve est considérée comme non qualifiée.

Essai : consiste à tester en parallèle une même substance d'essai sur au minimum deux réplicats de tissus conformément au mode opératoire normalisé correspondant.

Essai qualifié : essai qui remplit les critères d'acceptabilité définis dans le mode opératoire normalisé correspondant, et qui s'inscrit dans une épreuve qualifiée. Dans le cas contraire, l'essai est considéré comme non qualifié.

Fiabilité : mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (9).

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

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

NC : non corrosif

Normes de performance : normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de fiabilité et de précision similaires à ceux obtenus avec la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (9).

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

Réplique d'essai : méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Ce type d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (9).

Sensibilité : proportion de l'ensemble des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Séquence d'essais : nombre total d'essais indépendants réalisés sur une même substance d'essai dans un même laboratoire, y compris les essais réitérés. Une séquence d'essais peut comprendre des essais qualifiés et des essais non qualifiés.

Séquence d'essais complète : séquence d'essais comprenant trois essais qualifiés. Une séquence d'essais comprenant moins de 3 essais qualifiés est considérée comme incomplète (voir aussi la définition de « séquence d'essais » ci-dessus).

SGH de l'ONU [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies] : système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger

les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

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 (9).

Produit chimique testé: ce qui est testé.

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

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 3

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

Éléments de la méthode d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Surface du modèle	0.38 cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.6 cm ²
Nombre de répliquats de tissus	Au moins 2 par temps d'exposition	2-3 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition
Doses de traitement et application	<p><u>Liquides et matières visqueuses</u> : 50 µL ± 3 µL (131.6 µL/cm²)</p> <p><u>Solides</u> : 20 ± 2 mg (52.6 mg/cm²) + 100 µL ± 5µL de solution NaCl (9 g/L)</p> <p><u>Cires/matières collantes</u> : 50 ± 2 mg (131.6 mg/cm²) avec tulle de nylon</p>	<p><u>Liquides</u> : 50 µL (79.4 µL/cm²) avec ou sans tulle de nylon <i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i></p> <p><u>Semi-solides</u> : 50 µL (79.4 µL/cm²)</p> <p><u>Solides</u> : 25 µL de H₂O (ou plus si nécessaire) + 25 mg (39.7 mg/cm²)</p> <p><u>Cires</u> : disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µL de H₂O</p>	<p><u>Liquides et matières visqueuses</u> : 40 µL ± 3 µL (80 µL/cm²) avec tulle de nylon <i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i></p> <p><u>Solides</u> : 20 µL ± 2 µL de H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²)</p> <p><u>Cires /matières collantes</u> : 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) avec tulle de nylon</p>	<p><u>Liquides</u> : 50 µL (83.3 µL/cm²) avec tulle de nylon <i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i></p> <p><u>Semi-solides</u> : 50 µL (83.3 µL/cm²)</p> <p><u>Solides</u> : 25 mg (41.7 mg/cm²) + 25 µL de H₂O (ou plus si nécessaire)</p> <p><u>Cires</u> : disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µL de H₂O</p>

LD 431

OECD/OCDE

Éléments de la méthode d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pré-vérification de la réduction directe du MTT	50 µL (liquides) ou 20 mg (solides) + 2 mL de MTT 0.3 mg/mL de solution pendant 180 ± 5 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau	50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 mL de MTT 1 mg/mL de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation	40 µL (liquides) ou 20 mg (solides) + 1 mL de MTT 1 mg/mL de solution pendant 180± 15 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation	50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 mL de MTT 1 mg/mL de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation
Pré-vérification des interférences de couleur	10 µL (liquides) ou 10 mg (solides) + 90 µL de H ₂ O mélangés pendant 15 min à TA → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µL de H ₂ O pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	40 µL (liquides) ou 20 mg (solides) + 300 µL de H ₂ O mélangés pendant 60 min à TA → si la substance d'essai se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants	50 µL (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µL de H ₂ O pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus vivants
Temps d'exposition et température	3 min, 60 min (± 5 min) et 240 min (± 10 min) en armoire ventilée à température ambiante (TA, 18-28°C)	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %
Rinçage	25 mL 1x SSTP (2 mL/nettoyage)	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP

OECD/OCDE

LD 431

Éléments de la méthode d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Contrôle négatif	50 µL de solution NaCl (9 g/L) Testé pour chaque temps d'exposition	50 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	40 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	50 µL de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition
Contrôle positif	50 µL d'acide acétique glacial Testé pendant 4 heures seulement	50 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition	40 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pendant 1 heure seulement	50 µL d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition
Solution MTT	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL
Durée et température d'incubation du MTT	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %
Solvant d'extraction	500 µL d'isopropanol acidifié (0.04 de N HCl dans de l'isopropanol) (tissu isolé entièrement immergé)	2 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1.5 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	2 mL d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)
Durée et température d'extraction	Pendant une nuit à TA, à l'abri de la lumière	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 pm) à TA
Lecture de la DO	570 nm (545-595 nm) sans filtre de référence	570 nm (ou 540 nm) sans filtre de référence	570 nm (540- 600 nm) sans filtre de référence	540-570 nm sans filtre de référence
Contrôle de qualité des tissus	18 heures de traitement par SDS 1.0 mg/mL ≤ CI ₅₀ ≤ 3.0 mg/mL	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4.08 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 8.7 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4.0 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 10.0 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 2.0 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 7.0 heures

LD 431

OECD/OCDE

Éléments de la méthode d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (NaCl) doit être ≥ 0.6 et ≤ 1.5 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 4 heures au témoin positif (acide acétique glacial), exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 20 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO ≥ 0.3 , la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.8 et ≤ 2.8 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 15 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 %, le coefficient de variation (CV) entre les réplicats de tissus doit être ≤ 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.8 et ≤ 3.0 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure (et 4 heures le cas échéant) au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 15 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO ≥ 0.3 , la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H ₂ O) doit être ≥ 0.8 et ≤ 2.8 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 20 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO ≥ 0.3 , la différence de viabilité entre les deux réplicats ne doit pas dépasser 30%.

ANNEXE 4

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

Cette annexe présente un tableau illustrant les performances des quatre méthodes d'essai, déterminées à partir d'un ensemble de 80 produits chimiques testés par les quatre développeurs. Les calculs ont été réalisés par le Secrétariat de l'OCDE, puis revus et approuvés par un sous-groupe d'experts (23).

Les méthodes d'essai EpiSkinTM, EpiDermTM, SkinEthicTM et epiCS[®] sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives), mais des différences sont constatées en la matière entre EpiSkinTM et les trois autres méthodes d'essai, EpiDermTM, SkinEthicTM et epiCS[®]. Les résultats d'EpiSkinTM peuvent être utilisés tels quels, tandis que ceux d'EpiDermTM, SkinEthicTM et epiCS[®] présentent des taux élevés de surclassification en 1B et 1C (voir tableau 4.0 de l'annexe 4). C'est pourquoi, dans les méthodes d'essai EpiDermTM, SkinEthicTM, et epiCS[®] les produits chimiques classés en 1B et 1C peuvent être considérés comme relevant bien de ces sous-catégories, tandis que les produits chimiques pour lesquels la viabilité cellulaire à 3 minutes est inférieure à 50 % doivent seulement être classés dans la catégorie 1, puisqu'ils pourraient soit être classés en 1A en vertu du principe de prévision, soit subir d'autres essais pour éventuellement confirmer leur appartenance à 1B et 1C. L'utilisation de la présente Ligne directrice sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres.

Tableau 4.0 : Performances, taux de surclassification, taux de sous-classification et précision (valeur prédictive) des quatre méthodes d'essai à partir d'un ensemble de 80 produits chimiques, tous testés lors de 2 ou 3 épreuves pour chaque méthode d'essai.

STATISTIQUES SUR L'ENSEMBLE COMPLET DE PRODUITS CHIMIQUES				
(n = 80 produits chimiques, testés lors de 2 ou 3 épreuves, soit 159* ou 240 classifications)				
(* un produit chimique a été testé à une seule reprise à cause de son indisponibilité)				
	EpiDerm™	EpiSkin™	SkinEthic™	epiCS®
Surclassifications :				
Substances de cat. 1BC surclassées en 1A	41.94 %	21.50 %	46.24 %	45.90%
Substances non corrosives surclassées en 1BC	23.42 %	20.72 %	24.32 %	28.38%
Substances non corrosives surclassées en 1A	2.70 %	0.00 %	2.70 %	0.00%
Substances non corrosives surclassées comme corrosives	26.13 %	20.72 %	27.03 %	28.38%
Taux global de surclassification (toutes catégories)	28.33 %	17.92 %	30.42 %	30.82%
Sous-classifications :				
Substances de cat. 1A sous-classées en 1BC	8.33 %	16.67 %	13.89 %	8.33%
Substances de cat. 1A sous-classées comme non corrosives	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00%
Substances de cat. 1BC sous-classées comme non corrosives	0.00 %	2.15 %	7.53 %	6.56%
Taux global de sous-classification (toutes catégories)	2.47 %	3.33 %	5.00 %	3.77%
Classifications correctes :				
Correctement classées en 1A	91.67 %	83.33 %	86.11 %	91.67%
Correctement classées en 1BC	58.06 %	76.34 %	46.24 %	47.54%
Correctement classées comme non corrosives	73.87 %	79.28 %	72.97 %	71.62%
Précision (Valeur prédictive)	70.42 %	78.75 %	64.58 %	65.41%