

---

---

**Optique et instruments d'optique —  
Lentilles de contact — Détermination de la  
cytotoxicité des matériaux des lentilles de  
contact —**

iTeh STANDARD PREVIEW

**(Partie 1: standards.iteh.ai)**

Essai de diffusion à travers l'agar et essai  
d'inhibition de la croissance cellulaire

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e61f90b8-54cc-44ca-a176-1c3714f4d7eb/iso-9363-1-1994>

*Optics and optical instruments — Contact lenses — Determination of  
cytotoxicity of contact lens material —*

*Part 1: Agar overlay test and growth inhibition test*



## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 9363-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 172, *Optique et instruments d'optique*, sous-comité SC 7, *Instruments ophtalmiques, endoscopiques et métrologiques et méthodes d'essais*.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente partie de l'ISO 9363. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1994

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Version française tirée en 1995

Imprimé en Suisse

# Optique et instruments d'optique — Lentilles de contact — Détermination de la cytotoxicité des matériaux des lentilles de contact —

## Partie 1:

### Essai de diffusion à travers l'agar et essai d'inhibition de la croissance cellulaire

#### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 9363 prescrit deux méthodes in vitro pour la détermination de la cytotoxicité des matériaux des lentilles de contact.

- l'essai de diffusion à travers l'agar; et
- l'essai d'inhibition de la croissance cellulaire.

Ces essais ont pour objet principal de détecter la présence de substances cytotoxiques extractibles dans ou sur les lentilles de contact.

#### NOTES

- 1 L'attention est attirée sur l'ISO 10993-5.
- 2 Il est recommandé d'effectuer au moins un essai in vitro pour une évaluation préclinique des lentilles de contact neuves. On peut utiliser l'un ou l'autre des deux essais in vitro suivants.

#### 2 Principe

Les essais proposés sont conçus pour constater l'absence de substances cytotoxiques extractibles.

L'essai de diffusion à travers l'agar est conçu pour évaluer la présence de substances toxiques libérables dans les matériaux solides. L'échantillon pour essai est placé en contact avec la surface d'une couche d'agar qui couvre une couche monocellulaire traitée avec un colorant vital. Après 24 h d'incubation, la présence de substances toxiques extractibles se manifeste par la décoloration des cellules situées

dans la zone de diffusion de la (des) substance(s) soluble(s) sortant de l'échantillon et par la lyse des cellules dans cette zone si les concentrations et la toxicité de la (des) substance(s) diffusante(s) est (sont) suffisamment élevée(s).

L'essai d'inhibition de la croissance cellulaire a pour but d'évaluer la présence de substances cytotoxiques extractibles. La vitesse de croissance des cellules de mammifères diminue significativement en présence de substances toxiques. Généralement, le taux de croissance est déterminé en comparant le nombre de cellules ou la teneur en protéines des cellules à différents temps. Etant donné qu'il y a une relation linéaire entre le nombre de cellules et la concentration en protéines dans les conditions de l'essai décrit, la vitesse de croissance est déterminée par dosage des protéines. On peut utiliser le comptage des cellules comme autre méthode d'évaluation.

Dans l'essai d'inhibition de la croissance cellulaire, des extraits de matériau des lentilles de contact sont ajoutés au milieu de culture cellulaire et la teneur en protéines de la culture cellulaire après 72 h de contact avec l'extrait est comparée à la teneur en protéines des cultures de cellules sans extrait.

Pour assurer un travail de bonne qualité, il convient d'effectuer les essais de cytotoxicité des lentilles de contact dans des laboratoires expérimentés conformément aux principes généraux des B.P.L. Il convient que l'évaluation globale des résultats soit effectuée par un expert toxicologue informé sur le produit fini, les conditions de son utilisation et les données chimiques et biologiques appropriées sur ce produit.

### 3 Essai de diffusion à travers l'agar

#### 3.1 Appareillage et solutions

##### 3.1.1 Appareillage

Installations types pour la culture de tissus, comprenant un équipement de stérilisation (autoclave et filtration sur membrane), hotte à flux laminaire, incubateur dioxyde de carbone/air à 37 °C, bain-marie, verrerie et récipients plastiques pour culture de tissus.

##### 3.1.2 Milieu de culture

Le milieu de culture doit être stérile.

NOTE 3 À cet effet, on peut se procurer le milieu de culture stérile et prêt à l'emploi, ou le préparer à partir de composants stériles en utilisant des techniques aseptiques, ou, lorsqu'on ne dispose pas d'un ou de plusieurs composants sous forme stérile, on peut le stériliser après préparation par filtration sur membrane.

Le milieu de culture complet doit être le milieu modifié Eagle de Dulbecco, contenant 3,7 g/l de bicarbonate de sodium, 10 % (V/V) de sérum fœtal de veau (FCS), 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine ou de tout autre milieu de culture avec lequel on peut démontrer que l'on obtient des résultats reproductibles sur cinq essais.

##### 3.1.3 Milieu d'agar

Le milieu d'agar doit se composer d'un mélange à part égale de milieu de culture complet stérile à double concentration (tous les ajouts sont également à double concentration) et d'agarose ou équivalent stérile à 3 g/l dans de l'eau bidistillée ou équivalent.

Porter l'agarose fondu à environ 50 °C et le milieu à 37 °C dans un bain-marie, ou les deux à 42 °C, et mélanger dans des conditions aseptiques. Utiliser à 42 °C.

##### 3.1.4 Tampon phosphate salin (TPS) exempt de calcium et de magnésium

Le tampon phosphate salin doit se composer de 8,0 g de chlorure de sodium, 0,2 g de chlorure de potassium, 2,9 g d'hydrogénophosphate disodique dodécahydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 0,2 g de dihydrogénophosphate monopotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dissous dans de l'eau bidistillée ou équivalent (grade culture de cellule) afin d'obtenir 1 000 ml de solution. Ajuster le pH à 7,2, stériliser selon une méthode appropriée. Réchauffer à 37 °C avant utilisation.

##### 3.1.5 Colorant vital

Le colorant vital doit être du rouge neutre ou toute teinture vitale équivalente. Le colorant vital rouge neutre doit être préparé comme suit.

Solution mère: 1,0 g/l de rouge neutre dans de l'eau bidistillée. Ajuster le pH à 7,2, stériliser par filtration. Protéger de la lumière directe.

Colorant vital: 1:10 de solution mère dans du TPS stérile, préparer extemporanément et protéger de la lumière directe.

##### 3.1.6 Solution de trypsine

Une concentration appropriée (0,1 g/l à 0,25 g/l) de trypsine dans du TPS ou tout autre agent (pour dissocier la monocouche cellulaire) doit être utilisée pour la préparation des suspensions de cellules.

#### 3.2 Matériau à essayer

Le matériau à essayer doit être représentatif du produit fini. Il est nécessaire d'avoir au moins deux lentilles de contact par essai.

#### 3.3 Témoins

##### 3.3.1 Matériau témoin positif

Le témoin positif doit être un matériau qui, lors de l'essai selon la procédure décrite en 3.5.2, produit une réponse cytotoxique (tout matériau approprié et donnant une réponse cytotoxique reproductible).

##### 3.3.2 Matériau témoin négatif

Le témoin négatif doit être un matériau qui, lors de l'essai selon la procédure décrite en 3.5.2, ne produit pas de réponse cytotoxique (tout matériau approprié et reconnu non cytotoxique).

#### 3.4 Cellules

Utiliser une des lignées cellulaires suivantes:

- Le type de culture de la collection américaine, CCL 1, Clone 929 NCTC (tissu conjonctif, souris), clone de race L (ci-après référencé cellules L 929).
- Toute autre lignée cellulaire, à condition d'avoir obtenu, lors des essais conformément à la présente partie de l'ISO 9363, un niveau de toxicité reproductible pour le matériau témoin positif et de

n'avoir observé aucune cytotoxicité pour le matériau témoin négatif et le milieu de culture cellulaire frais.

#### NOTES

4 Il convient d'enregistrer le nombre de passages.

5 Il convient que les cultures souches stockées soient contrôlées avant utilisation pour vérifier l'absence de mycoplasme. La recherche des mycoplasmes peut être effectuée conformément à W.C. Russel *et al.* ou par toute autre méthode reconnue. Il convient de n'utiliser pour l'essai que des cellules exemptes de mycoplasme.

### 3.5 Mode opératoire et évaluation

#### 3.5.1 Préparation de l'échantillon

Les lentilles de contact devraient être appliquées directement sur la couche d'agar. L'essai de diffusion à travers l'agar ne nécessite pas d'échantillons stériles, bien que la stérilité soit souhaitable.

#### 3.5.2 Déroulement des essais

Utiliser les cellules L 929 provenant d'une culture en monocouche à croissance exponentielle.

Préparer une quantité suffisante de cellules. Retirer le milieu, laver deux fois avec du TPS, ajouter environ 3 ml de solution de trypsine par flacon de culture de tissus de 75 cm<sup>2</sup> et laisser incuber jusqu'à ce que les cellules se détachent (environ 3 min à 37 °C avec de la trypsine à 0,25 % dans du TPS).

Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 10 ml de milieu de culture complet, centrifuger pendant 10 min à 100 g et amener le milieu à  $2,5 \times 10^5$  cellules viables par millilitre. La viabilité des cellules doit être supérieure à 75 %; elle peut être déterminée par la méthode de coloration au bleu de trypan ou par toute autre méthode appropriée.

Déposer 10 ml (4,5 ml) de la suspension de cellules ajustée dans des boîtes de Petri à usage unique de 90 mm (60 mm) de diamètre et laisser incuber pendant 24 h à 37 °C dans de l'air humide contenant 5 % (V/V) de dioxyde de carbone.

Aspirer le milieu après incubation et ajouter 10 ml (4,5 ml) de milieu d'agar à 42 °C dans chaque boîte de Petri. Laisser le milieu d'agar se solidifier (environ 30 min dans l'incubateur).

Verser 10 ml (4,5 ml) de solution de colorant vital fraîchement préparé sur la surface de l'agar solidifié.

Laisser incuber les boîtes de Petri pendant 30 min à 37 °C dans l'obscurité et aspirer la solution de colorant excédentaire.

Placer deux spécimens du matériau à essayer, ainsi qu'un témoin négatif et un témoin positif symétriquement sur chacune des deux boîtes de Petri de 90 mm. Si l'on utilise des boîtes de Petri de 60 mm, placer un échantillon par plaque et utiliser deux plaques séparées pour chaque contrôle.

Pour les lentilles rigides, il est recommandé de placer une goutte d'agar sur la surface de l'agar avant de déposer la lentille pour éviter que celle-ci ne se déplace à la surface de l'agar.

Pour les lentilles hydrophiles, il est recommandé de faire deux ou trois coupes équidistantes sur la circonférence de la lentille afin de permettre de poser la lentille à plat sur la surface de l'agar. Laisser incuber pendant 24 h de plus à 37 °C dans de l'air humidifié contenant 5 % (V/V) de dioxyde de carbone.

#### 3.5.3 Résultats d'essai

Contrôler la réponse de la monocouche colorée par l'étendue de la décoloration (éventuelle) sous et autour de l'échantillon à essayer, à l'aide d'un microscope inversé ayant un grossissement de  $\times 100$ . Utiliser le système de comptage donné à l'annexe A.

Rejeter la plaque (pour les plaques de 90 mm) ou l'essai (pour les plaques de 60 mm) si la monocouche de cellules sous le témoin négatif ou autour de ce témoin, a perdu de la couleur, ou si l'on n'observe pas la réponse type du contrôle positif.

Le rouge neutre est un colorant redox qui est particulièrement concentré dans les lysosomes des cellules vitales. La décoloration des cellules est un premier signe de lésion cellulaire et précède le détachement du substrat et la lyse des cellules. Selon la solubilité dans l'eau et la concentration des substances toxiques de faible masse moléculaire dans la préparation, les cellules sous et autour de l'échantillon sont décolorées (indice de zone). Souvent, on observe une décoloration des cellules placées directement sous l'échantillon, mais sans lyse de cellules. Cependant, un matériau n'est jugé «cytotoxique» que si l'on observe simultanément la lyse. Si un matériau libère des composés cytotoxiques hautement diffusibles à faible concentration, il peut se produire une décoloration des cellules sans lyse. Un indice de zone de 2 ou plus sans lyse de cellules peut être considéré comme une réaction significative. En tous les cas, l'indice de réaction doit être indiqué et le résultat doit être interprété.



NOTE 6 Les matériaux des lentilles de contact hydrophiles peuvent absorber les teintures passivement, causant une décoloration qui n'est pas due aux effets cytotoxiques.

### 3.5.4 Considérations générales

Un indice de réponse positif de 1/1 ou plus est une indication définitive de la présence d'une substance toxique diffusable dans l'échantillon.

### 3.5.5 Évaluation des résultats

L'évaluation globale des résultats doit être effectuée par un expert toxicologue, familiarisé avec ce type d'essai. Si ce dernier considère que les résultats sont peu concluants ou non valables, l'essai doit être répété avec de nouveaux échantillons du matériau à essayer et, si nécessaire, une autre lignée cellulaire et/ou un autre milieu de culture.

## 4 Essai d'inhibition de la croissance cellulaire (mesurée par la détermination des protéines)

### 4.1 Appareillage et solutions

#### 4.1.1 Appareillage

Installations types de culture de tissus, comprenant un équipement de stérilisation (autoclave et filtration sur membrane), hotte à flux laminaire, incubateur d'air à dioxyde de carbone à 37 °C, bain-marie, verrerie et récipients plastiques pour culture des tissus.

#### 4.1.2 Milieu de culture

Le milieu de culture doit être stérile.

NOTE 7 À cet effet, on peut se procurer le milieu de culture stérile et prêt à l'emploi, ou le préparer à partir de composants stériles en utilisant des techniques aseptiques ou, lorsqu'on ne dispose pas d'un ou de plusieurs de ces composants sous forme stérile, on peut le stériliser après préparation par filtration sur membrane.

Le milieu de culture complet doit être le milieu modifié Eagle de Dulbecco, contenant 3,7 g/l de bicarbonate de sodium, 10 % (V/V) de sérum fœtal de veau (FCS), 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine ou de tout autre milieu de culture avec lequel on peut démontrer que l'on obtient des résultats reproductibles sur cinq essais.

### 4.1.3 Tampon phosphate salin (TPS) exempt de calcium et de magnésium.

Le tampon phosphate salin doit se composer de 8,0 g de chlorure de sodium, 0,2 g de chlorure de potassium, 2,9 g d'hydrogénophosphate disodique dodécahydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 0,2 g de dihydrogénophosphate monopotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dissous dans de l'eau bidistillée ou équivalent (grade culture de cellule) afin d'obtenir 1 000 ml de solution. Ajuster le pH à 7,2, stériliser selon une méthode appropriée et stocker à 4 °C. Réchauffer à 37 °C avant utilisation.

### 4.1.4 Solution de trypsine

On doit utiliser une concentration appropriée (0,1 g/l à 0,25 g/l) de trypsine dans du TPS ou tout agent approprié de désintégration des cellules pour la préparation des suspensions de cellules.

### 4.1.5 Solutions de Lowry

Solution A: 20,0 g de carbonate de sodium  
4,0 g d'hydroxyde de sodium  
dans 1 000 ml d'eau distillée ou équivalent.

Solution B: 2,0 g de tartrate de sodium et potassium  
dans 1 000 ml d'eau distillée ou équivalent.

Solution C: 2,0 g de sulfate de cuivre  
dans 1 000 ml d'eau distillée ou équivalent.

Solution D: Mélanger la solution B et la solution C dans un rapport de 1:1 (V/V).

Solution E: 98 parties de solution A  
2 parties de solution D  
Mélanger juste avant utilisation.

Solution F: 1 partie de réactif phénol Folin-Ciocalteus  
1 partie d'eau distillée ou équivalent  
Mélanger juste avant utilisation.  
Contrôler tout nouveau lot de réactif phénol avec une courbe type d'albumine de sérum bovin.

## 4.2 Matériaux à essayer

6 cm<sup>2</sup> de surface de lentilles de contact sont extraits par 1 ml de milieu de culture. On a besoin de 6 ml d'extrait par essai.

### NOTES

8 L'extraction polaire et non polaire sont également recommandées.

9 On a obtenu de bons résultats en appliquant une extraction à l'aide d'un solvant additionnel, par exemple 20 cm<sup>2</sup> de matériau par 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO).

### 4.3 Témoins

On utilise le milieu de culture comme contrôle négatif. Le matériau qui donne une réponse cytotoxique reproductible doit être considéré comme témoin positif.

### 4.4 Cellules

Utiliser les lignées cellulaires comme spécifié en 3.4.

## 4.5 Mode opératoire et évaluation

### 4.5.1 Préparation des extraits

Le matériau à essayer provenant des dispositifs préstérilisés doit être manipulé dans des conditions aseptiques pendant toute la procédure d'extraction et d'essai. Les matériaux à essayer provenant de dispositifs qui sont normalement fournis non stériles, mais qui sont stérilisés avant utilisation, doivent être stérilisés avant la procédure d'extraction.

Les matériaux à essayer provenant de dispositifs pour lesquels la stérilité n'est pas demandée lors de l'utilisation doivent être utilisés tels quels. Les matériaux doivent être manipulés de façon aseptique pendant toute la procédure d'extraction et d'essai.

Si, dans le cas de dispositifs non stériles, des extraits sont filtrés de façon stérile avant application, cela doit être mentionné dans le rapport final.

Extraire 36 cm<sup>2</sup> de matériau de lentille de contact avec 6 ml de milieu de culture complet pendant au moins 24 h à 37 °C.

Lorsqu'on utilise le DMSO comme solvant, extraire 20 cm<sup>2</sup> de matériau de lentille de contact avec 1 ml de DMSO pendant au moins 24 h à 37 °C. Ajouter l'extrait à 100 ml de milieu complet.

Après extraction, diluer les extraits avec du milieu complet à 30 %, 10 % et 3 % (V/V).

De même, préparer l'extrait du matériau témoin positif, mais ne l'utiliser que non dilué. Pour le témoin négatif, laisser incuber le milieu de culture sans le matériau à essayer dans des conditions identiques.

### 4.5.2 Préparation des cultures cellulaires

Utiliser les cellules L 929 provenant d'une culture en monocouche à croissance exponentielle.

Retirer le milieu, laver deux fois avec du TPS, ajouter 3 ml de solution de trypsine par flacon de culture de tissu de 75 cm<sup>2</sup> et laisser incuber pendant 3 min environ à 37 °C. Aider au détachement des cellules en remuant le flacon après incubation.

Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 10 ml de milieu de culture complet, centrifuger pendant 10 min à 100 g et amener le milieu à  $2,0 \times 10^5$  cellules viables par millilitre. La viabilité des cellules doit être supérieure à 75 %, ceci étant déterminé par exemple par exclusion du bleu trypan.

Utiliser des plaques multipuits (24 puits ayant une surface de base de 2 cm<sup>2</sup> chacun). On doit utiliser chaque fois trois puits pour

- le témoin négatif au début de l'expérimentation ( $C_0$ );
- le témoin négatif (teneur en protéines de la culture de cellules après 72 h d'incubation) ( $C_{72}$ );
- l'extrait de l'éprouvette (100 %) à soumettre à l'essai après 72 h ( $T_{100}$  %);
- l'extrait de l'éprouvette (30 %) à soumettre à l'essai après 72 h ( $T_{30}$  %);
- l'extrait de l'éprouvette (10 %) à soumettre à l'essai après 72 h ( $T_{10}$  %);
- l'extrait de l'éprouvette (3 %) à soumettre à l'essai après 72 h ( $T_3$  %);
- l'extrait du matériau du témoin positif ( $C_p$ ).

Essayer les extraits d'un échantillon en ajoutant 1,0 ml d'extrait (non dilué ou dilué) dans 3 puits chacun (T), 1,0 ml de milieu pré-incubé dans chacun des trois puits pour ( $C_0$ ) et ( $C_{72}$ ), 1,0 ml d'extrait du témoin positif dans 3 puits ( $C_p$ ) et 0,2 ml de la suspension de cellule ajustée dans chacun des puits.

Laisser incuber les plaques multipuits à 37 °C dans de l'air humide contenant 5 % (V/V) de dioxyde de carbone. Après 1 h, aspirer le milieu dans les puits témoins ( $C_0$ ) et laver trois fois avec du TPS. Tester les cellules témoins pour la teneur en protéines. Continuer l'incubation des plaques multipuits pendant 72 h. Aspirer ensuite les liquides excédentaires et laver les couches de cellules trois fois avec du TPS à 37 °C.

Effectuer la détermination des protéines selon Lowry comme suit. Ajouter 2,0 ml de solution Lowry E à chaque puits et laisser les plaques multipuits dans

l'obscurité pendant 1 h à la température ambiante. Verser ensuite 0,2 ml de solution Lowry F dans chaque puits, mélanger intimement et continuer l'incubation dans l'obscurité pendant encore 30 min. Mesurer la densité optique à 660 nm juste après cette période d'incubation.

#### NOTES

10 Si nécessaire, il convient d'effectuer une dilution appropriée 1 h après avoir ajouté la solution Lowry E, en ajoutant de la solution Lowry E avant d'ajouter la solution de Lowry F.

11 La densité optique est proportionnelle à la teneur en protéines des puits. On peut effectuer un comptage des cellules à l'aide d'un hémocytomètre à la place de la détermination des protéines.

#### 4.5.3 Résultats d'essai

Étant donné qu'il y a une relation linéaire entre le nombre de cellules et la concentration en protéines dans les conditions de l'essai, le pourcentage d'inhibition de la croissance (% IC) des cellules en présence de l'extrait est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ IC} = 100 - 100 \times \frac{A_{660}(\text{T}) - A_{660}(\text{C}_0)}{A_{660}(\text{C}_{72}) - A_{660}(\text{C}_0)}$$

où

$A_{660}(\text{T})$  est la densité optique à 660 nm en présence de l'extrait ou de la dilution de l'extrait;

$A_{660}(\text{C}_0)$  est la densité optique à 660 nm en

présence du témoin négatif au début de l'expérimentation;

$A_{660}(\text{C}_{72})$  est la densité optique à 660 nm en présence du témoin négatif après 72 h d'incubation;

$A_{660}(\text{C}_p)$  est la densité optique à 660 nm en présence du matériau du témoin positif.

L'inhibition de la croissance cellulaire pour le matériau témoin positif se calcule en remplaçant (T) par ( $C_p$ ) dans la formule ci-dessus.

#### 4.5.4 Considérations générales

Un échantillon est considéré comme cytotoxique si l'on observe une courbe réponse dose/dilution non équivoque et qu'au moins une dilution d'essai présente une réponse cytotoxique. Dans les conditions d'essai décrites, on considère qu'un extrait non dilué qui donne une inhibition de croissance de plus de 30 %, est cytotoxique.

NOTE 12 Ceci est statistiquement significatif.

Refaire l'essai si l'on n'observe pas de réponse type, ni du témoin milieu de culture, ni du témoin positif.

#### 4.5.5 Évaluation des résultats

L'évaluation globale des résultats d'essai doit être effectuée par un expert toxicologue. Si ce dernier considère que les résultats sont peu probants ou non valables, l'essai doit être refait à l'aide de nouveaux extraits et, si nécessaire, d'une autre lignée cellulaire et/ou d'un autre milieu de culture.



## Annexe A (normative)

### Système d'évaluation

#### A.1 Indice de zone (Z)

Indice de zone, Z	Description de zone
0	Pas de zone détectable autour de l'échantillon ou sous l'échantillon.
1	Zone limitée à la surface directement sous l'échantillon.
2	Zone $\leq$ 5 mm autour de l'échantillon.
3	Zone $\leq$ 10 mm autour de l'échantillon.
4	Zone $>$ 10 mm autour de l'échantillon mais ne couvrant pas toute la plaque.
5	Zone couvrant toute la plaque.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

#### A.2 Indice de lyse (L)

L'ampleur de la lyse (éventuelle) des cellules dans la zone de décoloration est évaluée comme suit:

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e61f90b8-54cc-44ca-a176-1c3714f4d7eb/iso-9363-1-1994>

Indice de lyse, L	Description de l'ampleur de la lyse
0	Pas de lyse observable.
1	Jusqu'à 20 % des cellules lysées.
2	Entre 20 % et 40 % des cellules lysées.
3	Entre 40 % et 60 % des cellules lysées.
4	Entre 60 % et 80 % des cellules lysées.
5	Plus de 80 % des cellules lysées.

#### A.3 Indice de réponse (R)

La réponse est consignée en termes d'«indice de réponse» R (= Z/L).

Évaluation	Interprétation	Indice de réponse, R (moyenne de deux échantillons)
0	Non cytotoxique.	0/0 à 0,5/0,5 <sup>1)</sup> ou 1/0
1	Légèrement cytotoxique.	1/1 à 1,5/1,5
2	Modérément cytotoxique.	2/2 à 3/3
3	Fortement cytotoxique.	4/4 à 5/5

1) Si un indice de réponse de 0,5/0,5 est obtenu d'après la moyenne de deux essais avec des résultats de 1/1 et 0/0, l'essai doit être répété.