

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 056 227**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **16 58746**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/68 (2016.01), C 12 Q 1/02**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 METHODE D'EVALUATION DU POTENTIEL D'IRRITATION OCULAIRE DE PRODUITS CHIMIQUES.

②2 Date de dépôt : 19.09.16.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 23.03.18 Bulletin 18/12.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 01.01.21 Bulletin 20/53.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *IMMUNOSEARCH Société à
responsabilité limitée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : GROUX HERVE, COTTREZ
FRANCOISE, ALEPEE NATHALIE et LEBLANC
VIRGINIE.

⑦3 Titulaire(s) : IMMUNOSEARCH Société à
responsabilité limitée.

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

FR 3 056 227 - B1



METHODE D'EVALUATION DU POTENTIEL D'IRRITATION OCULAIRE DE
PRODUITS CHIMIQUES

La présente invention concerne une méthode d'évaluation et de catégorisation du potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques.

Pour évaluer l'innocuité de produits chimiques au niveau de l'œil, on connaît le test de Draize qui est un test toxicologique invasif basé sur un protocole d'expérimentation animale, mis au point en 1944 par John H. Draize et Jacob M. Spines, toxicologues de la *Food and Drug Administration* (FDA). Le test consiste à tester un produit dans l'œil d'un animal afin d'évaluer son innocuité oculaire.

En pratique, il consiste à appliquer 0,1 millilitre ou 0,1 gramme d'une substance dans l'œil d'un animal conscient, souvent un lapin, pendant une à vingt-quatre heures. On observe ensuite, pendant une durée qui peut aller jusqu'à 21 jours, l'éventuelle apparition d'une opacité de la cornée, d'une conjonctivite, d'un oedème, ou encore de sécrétions.

L'utilisation d'animaux en laboratoire dans le cadre du test de Draize est un sujet combattu par les défenseurs des animaux. Au sein de l'Union européenne, l'expérimentation animale est encadrée par la directive 2010/63, qui encourage le développement de méthodes de tests alternatives.

Les produits chimiques sont classifiés selon un système globalisé et mis en place par les Nations Unies connu sous le terme *United Nations Globally Harmonized System* et concernant les propriétés d'irritation oculaire, les

produits sont classés en plusieurs catégories. La catégorie 1 concerne les produits causant des dommages dont on ne constate pas la réversibilité après 21 jours, la catégorie 2A concerne les produits irritants pour les yeux de manière réversible avant 21 jours et la catégorie 2B concerne les produits moyennement irritants pour les yeux de manière réversible avant 21 jours. Les produits non irritants ne sont pas classifiés. La législation Européenne combine les catégories 2A et 2B en une seule catégorie 2 qualifiée d'irritante de manière réversible pour les yeux.

On connaît aussi un procédé pour estimer l'inconfort oculaire ou le potentiel irritant d'un produit chimique tel qu'un produit cosmétique. Ce procédé comprend la culture in vitro d'un modèle d'épiderme, le dépôt du produit que l'on souhaite étudier sur modèle d'épiderme cultivé, et la quantification du nombre de cellules vivantes survivantes afin d'évaluer l'inconfort oculaire ou le potentiel irritant de celui-ci. Un tel procédé, développé en remplacement de l'expérimentation animale, présente l'inconvénient d'être long et coûteux et peu discriminant. De plus cette méthode ne constitue pas une méthode de remplacement intégrale, puisqu'elle ne permet pas de détecter de façon fiable toute la gamme d'irritations intermédiaires.

Ainsi, il apparaît qu'il existe un besoin en un test ou méthode permettant d'une part de remplacer le test de Draize et de fournir en particulier une méthode permettant de différencier et de catégoriser rapidement les composés causant une irritation oculaire irréversible à 21 jours de ceux dont les effets sont réversibles avant 21 jours.

Les inventeurs de la présente demande se sont donc penchés sur le développement d'un test in vitro pour la détection du potentiel irritant de produits chimiques combinant un modèle cellulaire cornéal à une sélection de marqueurs moléculaires prédictifs et qualitatifs permettant de classifier les composés en 3 catégories, à savoir dommages non réversibles aux yeux 21 jours après application (catégorie 1), dommages réversibles aux yeux 21 jours après application (catégorie 2) et non irritation (no
5
10
Catégorie).

De manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence que la réponse consécutive à l'action d'une substance irritante se fait directement sur un épithélium cornéal reconstruit in vitro, et que le degré d'irritation, et la qualification de cette irritation d'une molécule, peut être déterminé grâce à l'utilisation de biomarqueurs spécifiques de l'irritation oculaire. Il est notable de remarquer, et cela constitue une caractéristique surprenante de la présente méthode, que les marqueurs moléculaires mise en œuvre n'ont jamais été décrits ou divulgués en relation avec l'irritation oculaire.
15
20

Les Inventeurs ont mis en évidence qu'un épithélium cornéal reconstruit in vitro constitue un modèle suffisant pour mettre en évidence des biomarqueurs spécifiques de l'irritation oculaire chez l'homme, et que ces biomarqueurs permettent en outre de prédire le degré d'irritation et donc de classifier de manière prédictive les produits testés selon les 3 catégories telles qu'indiquées plus
25
30
avant.

Ainsi, la présente invention se rapporte à une méthode d'évaluation du potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, comprenant les étapes de:

5 a) mise en contact d'un composé test avec un échantillon cornéal reconstruit *in vitro*;

b) mesure de l'expression d'au moins un gène choisi dans le groupe constitué par : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL,
10 COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

De préférence, la méthode selon la présente invention peut comprendre en outre une étape c) de détermination d'un index d'irritation oculaire d'un composé test.

Préférentiellement, la méthode comprend aussi une étape d)
15 de catégorisation dudit composé comme présentant un potentiel d'irritation oculaire selon la valeur de l'index d'irritation oculaire obtenu.

De préférence, la méthode selon la présente invention est une méthode *in vitro*.

20 Tel qu'utilisé ici, le terme « échantillon cornéal reconstruit *in vitro* » se réfère à un échantillon de cellules épithéliales de cornée cultivées en milieu de culture défini ou tout modèle utilisant des cellules épithéliales squameuses humaines et présentant une
25 morphologie similaire à la cornée humaine, tels que les modèles de cornée *in vitro* du type de ceux commercialisés sous la marque EpiOcular®.

Plus particulièrement encore, cet « échantillon cornéal reconstruit *in vitro* » est un échantillon comprenant, ou

constitué par, des cellules épithéliales de cornée immortalisées, cultivées en milieu de culture défini et disposées en couche fine sur une membrane synthétique à l'interface eau-air.

- 5 De préférence, lesdites cellules épithéliales de cornée immortalisées sont des cellules humaines.

Dans un mode de réalisation particulier, cet « échantillon cornéal reconstruit in vitro » est un échantillon HCE SkinEthic® commercialisé par la société Episkin (Lyon, France) qui est un épithélium de cornée reconstruit constitué de kératinocytes de cornée humaine, particulièrement des cellules transformées pour être rendues immortelles.

15 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous la forme solide, par exemple en poudre.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous la forme liquide.

20 Au sens de la présente invention, la mesure de l'expression dudit au moins un gène de l'étape b) permet de déterminer le niveau d'expression dudit gène.

25

Le composé test peut être un composé de nature, structure et origine variées, notamment un composé biologique, un composé chimique, synthétique, etc.

Le composé test peut être tout produit qui se présente sous une forme isolée ou en mélange avec d'autres produits. Le composé test peut être défini en termes de structure et/ou de composition ou être défini sur le plan fonctionnel. Le composé test peut, par exemple, être un produit isolé et structurellement défini, un produit isolé de structure indéfinie, un mélange de produits connus et caractérisés ou une composition comprenant un ou plusieurs produits. Un ou plusieurs composés peuvent ainsi être testés, en mélange ou de manière séparée.

La présente invention est particulièrement adaptée à l'identification d'un nombre important de composés. Ce criblage simple et efficace peut être accompli en un laps de temps très court. Les méthodes décrites peuvent en particulier être partiellement automatisées, autorisant ainsi le criblage efficace et simultané de composés divers et nombreux, soit sous forme de mélange soit sous forme séparée.

20

De préférence, dans la méthode selon la présente invention, le niveau d'expression dudit gène est évalué par mesure du niveau d'expression du polypeptide codé par ledit gène ou un fragment de celui-ci, ou par mesure du niveau d'expression de l'ARNm dudit gène ou d'un fragment de celui-ci.

Dans un mode de réalisation préféré, l'expression dudit au moins un gène est effectuée par analyse de l'expression de transcrits d'ARNm ou de précurseurs d'ARNm, tel qu'un ARN

natif, dudit gène. Ladite analyse peut être réalisée en préparant l'ARNm/ADNc de cellules d'un échantillon biologique d'un patient, et hybridation de l'ARNm /ADNc avec un polynucléotide de référence. L'ARNm/ADNc préparé
5 peut être utilisé dans une analyse par hybridation ou amplification qui inclut, sans s'y limiter, les analyses Southern et Northern, les analyses par PCR (« polymerase chain reaction »), telle que la PCR quantitative (Taqman) et l'utilisation de sondes (« probes arrays ») telles que
10 les matrices ADN GeneChip®(AFFYMETRIX).

Avantageusement, l'analyse de l'expression du niveau d'ARNm transcrit dudit au moins un gène implique un procédé d'amplification des acides nucléiques, comme par exemple la RT-PCR (mode de réalisation expérimental décrit dans le
15 Brevet US 4,683,202), la réaction en chaîne par la ligase (BARANY, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.88, p: 189-193, 1991), la répllication de séquences auto-entretenu (« self sustained sequence replication ») (GUATELLI *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.87, p: 1874-1878, 1990), le
20 système d'amplification transcriptionnelle. (KWOH *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.86, p: 1173-1177, 1989), la « Q-Beta Replicase » (LIZARDI *et al.*, *Biol. Technology*, vol.6, p: 1197, 1988), la « rolling circle replication » (U. S. Patent No. 5,854,033) ou toute autre méthode
25 d'amplification d'acides nucléiques, suivie d'une étape de détection des molécules amplifiées par des techniques bien connues de l'homme du métier. Ces modes de détection sont particulièrement utiles pour la détection de molécules d'acides nucléiques en très faibles quantités.

30 Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, la méthode selon la présente invention comprend une étape supplémentaire d'amplification de l'ARNm ou de l'ADNc dudit

gène, de la séquence complémentaire de celle-ci ou d'un fragment de celle-ci.

Telles qu'utilisées ici, les amorces d'amplifications sont
5 définies comme étant une paire de molécules d'acides
nucléiques qui peuvent s'apparier respectivement aux
régions 3' et 5' d'un gène de façon spécifique (brins
positif et négatif, ou inversement) et encadrent une courte
région dudit gène. De manière générale, les amorces
10 d'amplification ont une longueur de 10 à 30 nucléotides et
permettent l'amplification d'une région d'une longueur
comprise entre 50 et 200 nucléotides.

Dans un autre mode de réalisation préféré, la mesure de
15 l'expression dudit au moins un gène est réalisée par mesure
du niveau d'expression du polypeptide codé par ledit gène.
Ladite analyse peut être réalisée en utilisant un anticorps
(par exemple, un anticorps radiomarqué, marqué avec un
chromophore, un fluorophore, ou une enzyme), un dérivé
20 d'anticorps (par exemple un anticorps conjugué à un
substrat ou à une protéine ou un ligand d'une protéine d'un
couple ligand/protéine (par exemple biotine-streptavidine))
ou un fragment d'anticorps (par exemple un anticorps à une
seule chaîne, un domaine hypervariable d'un anticorps
25 isolé, etc.) qui se lie spécifiquement au polypeptide codé
par ledit gène. Lesdites analyses peuvent être réalisées
par de nombreuses techniques à la portée de l'homme du
métier incluant, sans s'y limiter, les tests immunologiques
basés sur l'utilisation d'activité enzymatique (« enzyme
30 immunoassay » EIA), les tests immunologiques basés sur
l'utilisation d'isotopes radioactifs (RIA), l'analyse par

Western blot et les tests ELISA (« enzyme linked immunoabsorbant assay »).

Au sens de la présente invention, on entend par
5 « polypeptide » une séquence comprenant au moins deux acides aminés, et les termes « polypeptide », « peptide » et « protéine » peuvent être indifféremment utilisés.

Par « fragment de l'ARNm ou de l'ADNc », on entend une
10 séquence d'au moins 50 acides nucléiques, à titre d'exemple d'au moins 100 ou 150 acides nucléiques, de préférence d'au moins 200 acides nucléiques, à titre d'exemple d'au moins 250 ou 350 acides nucléiques, et de manière particulièrement préférée un polypeptide d'au moins 400
15 acides nucléiques.

Par « fragment du polypeptide », on entend une séquence d'au moins 50 acides aminés, à titre d'exemple d'au moins 100 ou 150 acides aminés, de préférence d'au moins 200
20 acides aminés, à titre d'exemple d'au moins 250 ou 350 acides aminés, et de manière particulièrement préférée un polypeptide d'au moins 400 acides aminés.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans
25 laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins deux gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR,

IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins trois gènes choisis dans le groupe constitué par :
5 HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3,
10 MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins quatre gènes choisis dans le groupe constitué par :
15 HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins cinq gènes choisis dans le groupe constitué par :
20 HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3,
25 MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins six gènes choisis dans le groupe constitué par :
30 HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1,

CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le
5 potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans
laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au
moins sept gènes choisis dans le groupe constitué par :
HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1,
CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR,
10 IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3,
MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le
potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans
laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au
15 moins huit gènes choisis dans le groupe constitué par :
HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1,
CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR,
IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3,
MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le
20 potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans
laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au
moins neuf gènes choisis dans le groupe constitué par :
HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1,
25 CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR,
IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3,
MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le
potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans
30 laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au
moins dix gènes choisis dans le groupe constitué par :

HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

- 5 Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins onze gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, 10 CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

- Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au 15 moins douze gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, 20 MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

- Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins treize gènes choisis dans le groupe constitué par : 25 HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins un gène choisi dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 et CCND1.

10 Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins deux gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins trois gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins quatre gènes choisis dans le groupe

constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins cinq gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins six gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins sept gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de

l'expression d'au moins huit gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1.

5 Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins neuf gènes choisis dans le groupe
10 constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à
15 l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme liquide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression des gènes du groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1.

20 Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de
25 l'expression d'au moins un gène choisi dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en
30 particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme

solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins deux gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

5 Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de
10 l'expression d'au moins trois gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en
15 particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins quatre gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1,
20 HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en
particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme
25 solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins cinq gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le
30 potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à

l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins six gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, 5 CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme 10 solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins sept gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le 15 potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins huit gènes choisis dans le groupe 20 constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le 25 potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins neuf gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

30 Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en

particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins dix gènes choisis dans le groupe
5 constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à
10 l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins onze gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme
15 solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins douze gènes choisis dans le groupe
20 constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Préférentiellement, ladite méthode permet d'évaluer le potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, en particulier lorsque la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous forme
25 solide, dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression des gènes du groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2,
30 CASP1, MUC13 et MUC4.

Dans un mode de réalisation particulier de la méthode, lors de l'étape a), le composé test mis en contact avec l'échantillon cornéal reconstruit in vitro est sous la forme liquide ou solide. Lorsque le composé test est
5 liquide, il peut être utilisé pur ou dilué.

Le composé peut être dilué dans un solvant physiologiquement acceptable, tel qu'un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) par exemple, et est donc présent à une concentration massique comprise entre 0.1 % et 100%.
10 Lorsque le composé est dilué il est présent à une concentration massique comprise entre 10 et 60%, plus particulièrement entre 20 et 50%, plus particulièrement entre 25 et 40% et plus particulièrement encore 30%.

15 L'étape c) de la méthode comprend la détermination d'un index d'irritation oculaire du composé.

Plus particulièrement, la détermination de l'index d'irritation oculaire du composé comprend l'attribution d'une valeur seuil de surexpression à chaque gène dont
20 l'expression est mesurée.

La valeur seuil de surexpression correspond à un facteur d'augmentation de l'expression du gène lors de la mise en contact avec le composé à tester par rapport à l'expression dudit gène lors de la mise en contact avec un témoin.

25 De préférence, la méthode selon la présente invention comprend en outre une étape de comparaison du niveau d'expression dudit gène avec une valeur de référence. Cette valeur de référence peut servir de contrôle positif et/ou négatif.

Un contrôle positif peut par exemple être effectué en comparant le niveau d'expression dudit au moins un gène en présence du composé test avec le niveau d'expression dudit
5 au moins un gène en présence d'un composé connu comme irritant oculaire.

Par exemple, si le niveau d'expression dudit au moins un gène en présence du composé test est supérieur ou égal au
10 niveau d'expression dudit au moins un gène en présence d'un composé dont le potentiel irritant est connu, on pourra en conclure au potentiel irritant dudit composé.

15

Un contrôle négatif peut être réalisé en l'absence du composé test ou en présence d'un composé connu comme non irritant comme par exemple l'huile d'olive, le 1, 9-
20 decadiene (CAS # 1647-16-1), le triclobarban (cas # 101-20-2) ou le tampon dans lequel le produit à tester est dissout ou dilué lors de son utilisation dans la méthode.

Dans le cadre de la présente invention, on pourra conclure qu'un composé test présente un potentiel irritant oculaire
25 si une surexpression dudit gène est observée par rapport à son niveau d'expression en l'absence dudit composé test.

On entend par « surexpression », un niveau d'expression significativement plus élevé dudit gène par rapport à son niveau d'expression normal. De préférence, on entend par surexpression un niveau d'expression dans un échantillon
5 biologique qui est supérieur à au moins 20% du niveau normal d'expression dudit gène (c'est-à-dire 1,2 fois plus), de préférence supérieur à au moins 50% du niveau normal d'expression dudit gène (c'est-à-dire 1,5 fois plus), et de manière particulièrement préférée supérieur
10 d'au moins 90% au niveau normal d'expression dudit gène (c'est-à-dire aussi 1,9 fois plus).

Le « niveau d'expression en l'absence dudit composé test » ou « niveau normal » est le niveau d'expression dudit gène dans un échantillon contrôle correspondant potentiellement
15 à l'échantillon biologique d'un tissu ne présentant pas de réaction de d'irritation ou, de préférence, à la moyenne du niveau d'expression dudit gène dans différents échantillons contrôle non exposé au composé test.

20 De préférence, l'étape b) est réalisé entre 2 et 24 heures après l'étape a), de manière encore préférée entre 4 et 18 heures après l'étape a), de manière particulièrement préférée entre 5 et 7 heures après l'étape a) et de manière encore plus préférée 6 heures après l'étape a).

25

Le témoin présentant un niveau d'expression normal consiste à la mise en contact de l'échantillon cornéal reconstruit in vitro avec un liquide physiologiquement acceptable non
30 irritant, tel que par exemple le liquide dans lequel est

dissout ou dilué le composé à tester, par exemple un tampon, plus particulièrement par exemple un tampon PBS.

La valeur seuil indiquant une surexpression significative du gène dont l'expression est mesurée peut être comprise en
5 1,1 et 10, plus particulièrement entre 1,1 et 7, plus particulièrement entre 1,4 et 6, plus particulièrement encore entre 2 et 5, plus particulièrement encore entre 2 et 4.

Comme indiqué plus avant dans un des groupes de gènes
10 sélectionnés, dans le cas de composés test mis en contact à l'étape a) sous la forme liquide, les gènes préférés sont choisis dans le groupe comprenant au moins, ou consistant en, HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 et CCND1.

15 Pour HSP90AA1, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2, plus particulièrement 1,4.

Pour CASP1, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2, plus particulièrement environ 1,5.

Pour DLK1, la valeur seuil de surexpression est comprise
20 entre 3 et 8, plus particulièrement environ 5, plus particulièrement encore 5,25.

Pour CLEC4D, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 4, plus particulièrement environ 3,6.

Pour IL-24, la valeur seuil de surexpression est comprise
25 entre 3 et 8, plus particulièrement environ 6,2.

Pour SLIT2, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2, plus particulièrement environ 1,3.

Pour HSPA1A, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 5, plus particulièrement environ 3.

Pour FSHR, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 4, plus particulièrement environ 2,6.

5 Pour IL-1R2, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2, plus particulièrement environ 1,3.

Pour CCND1, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2, plus particulièrement environ 1,5.

10 Comme indiqué plus avant pour un autre groupe de gènes possibles, dans le cas de composés test mis en contact à l'étape a) sous la forme solide, les gènes préférés sont choisis dans le groupe comprenant au moins, ou consistant en, IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2
15 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

Pour IL-24, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,5 et 15, plus particulièrement entre 2 et 10, plus particulièrement 2,3.

Pour IL-24, la valeur seuil de surexpression peut aussi
20 être comprise entre 5 et 15, plus particulièrement 10.

Pour IL-23R, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,5 et 3, plus particulièrement environ 1,9.

Pour DDIT3, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1.5 et 3, plus particulièrement environ 5, plus
25 particulièrement encore 2.

Pour MMP8, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2.5, plus particulièrement environ 1.4.

Pour DLK1, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 2 et 8, plus particulièrement environ 4.

Pour HAS1, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,5 et 5, plus particulièrement environ 3.

5 Pour CYR61, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,1 et 2, plus particulièrement environ 1.3.

Pour IL-1R2, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,4 et 3, plus particulièrement environ 2.

10 Pour CLEC4D, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1,5 et 3.5, plus particulièrement environ 2.8.

Pour ICAM2, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 3 et 5, plus particulièrement environ 4.

Pour CASP1, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1.1 et 2, plus particulièrement environ 1.4.

15 Pour MUC13, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 1.4 et 3, plus particulièrement environ 1.8.

Pour MUC4, la valeur seuil de surexpression est comprise entre 2 et 4, plus particulièrement environ 2.5.

20

La valeur de seuil de surexpression significative peut, pour chaque gène, être évaluée et déterminée aisément par un homme du métier.

25 Plus particulièrement encore, la détermination de l'index d'irritation oculaire comprend l'attribution d'une valeur

de poids à chaque gène si la valeur seuil de surexpression dudit gène est atteinte suite à la mesure de l'expression.

Ainsi lorsque le seuil de surexpression significative d'un gène donné est atteint, ce gène se voit attribuer une valeur de poids qui peut être différente ou identique selon le gène. Cette valeur de poids peut prendre des valeurs discrètes ou continues, préférentiellement des valeurs discrètes échelonnées entre 1 et 10, à savoir choisies dans le groupe consistant en les valeurs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10. Plus particulièrement, les valeurs discrètes pourront être choisies dans le groupe consistant en les valeurs 1, 2, 3, 4, 5. Plus particulièrement, lesdites valeurs discrètes pourront être 1 ou 2.

A titre illustratif et sans être nullement limitatif, la valeur de poids pourra être limitée à deux valeurs, 1 ou 2, valeur qui sera attribuée au gène lorsque son seuil de surexpression significative sera atteint ou dépassé.

Le choix d'attribuer une valeur de poids plus ou moins élevée dépend de la nature du gène considéré et de son implication qui dans la réponse cellulaire au stress, qui dans la voie métabolique de l'interleukine, qui dans le processus inflammatoire, qui dans la régulation de la croissance cellulaire, qui dans la cicatrisation, qui dans le remodelage cellulaire, par exemple mais aussi de la valeur de seuil de surexpression du gène.

Aussi à titre purement illustratif et pour les gènes ici sélectionnés choisis dans le groupe comprenant, ou consistant en, HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 et CCND1 ; la valeur de poids pourra prendre un valeur choisie entre 1 et 2.

Pour HSP90AA1, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour CASP1, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour DLK1, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour CLEC4D, la valeur de poids pourra être de 2.

5 Pour IL24, la valeur de poids pourra être de 1.

Pour SLIT2, la valeur de poids pourra être de 1.

Pour HSPA1A, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour FSHR, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour IL-1R2, la valeur de poids pourra être de 1.

10 Pour CCND1, la valeur de poids pourra être de 2.

De la même façon, et pour les gènes ici sélectionnés choisis dans le groupe comprenant, ou consistant en, IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D,
15 ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4 ; la valeur de poids pourra prendre un valeur choisie entre 1 et 4.

Pour IL-24, avec une valeur seuil surexpression de 2.3, la valeur de poids pourra être de 1.

Pour IL-24, avec une valeur seuil de surexpression de 10,
20 la valeur de poids pourra être de 4.

Pour IL-23R, la valeur de poids pourra être de 4.

Pour DDIT3, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour MMP8, la valeur de poids pourra être de 1.

Pour DLK1, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour HAS1, la valeur de poids pourra être de 2.

Pour CYR61, la valeur de poids pourra être de 1.

Pour IL-1R2, la valeur de poids pourra être de 4.

Pour CLEC4D, la valeur de poids pourra être de 2.

5 Pour ICAM2, la valeur de poids pourra être de 4.

Pour CASP1 la valeur de poids pourra être de 2.

Pour MUC13, la valeur de poids pourra être de 3.

Pour MUC4, la valeur de poids pourra être de 4.

10

Plus particulièrement, l'index d'irritation oculaire est déterminé par l'addition des valeurs de poids des gènes dont l'expression dépasse la valeur seuil de surexpression.

15 La méthode selon l'invention peut aussi comprendre une étape de catégorisation du composé test comprenant l'attribution d'une catégorie d'irritation au composé test en fonction de la valeur de l'index d'irritation oculaire obtenu.

20 La méthode selon l'invention met ainsi à disposition de l'homme du métier un méthode prédictive permettant de classifier un composé selon son potentiel d'irritation oculaire en suivant la classification Européenne, à savoir non irritant, irritant réversible ou irritant non
25 réversible.

Les résultats exposés dans la partie expérimentale de la présente demande démontre cet avantage de l'invention et la supériorité de cette méthode par rapport à celles existantes ressort à l'évidence de ces résultats.

5

EXEMPLES

Matériels et Méthodes

10 Modèle d'épithélium de cornée humaine reconstruit (SkinEthic™ HCE)

Le modèle d'épithélium de cornée humaine reconstruit, (SkinEthic™ HCE) a été acheté chez Episkin à Lyon. Le modèle est constitué de cellules épithéliales de cornée humaine immortalisées cultivées dans un milieu défini à la jonction air-liquide. La structure tissulaire obtenue est un épithélium multi-couche similaire à la structure tissulaire naturelle de la cornée humaine comprenant 5 -7 couches pour une surface de 0,5 cm². Les cellules polyédriques et les cellules ailées sont également présentes. Le tissu comprend aussi des ultra-structures spécifiques comme les filaments intermédiaires, les hémidesmosomes matures et les desmosomes. La cytokératine de 65 kD (K3) a également été détectée (Nguyen et al., 2003). Les tissus sont expédiés sur une couche semi-solide de milieu de culture en agarose. A réception, les tissus sont transférés dans du milieu de maintenance (1 ml/puit) dans des plaques 6 puits et incubés dans une étuve humide à 37°C, 5% CO₂. Les tissus sont utilisés 24h plus tard.

Produits chimiques

Tous les produits chimiques testés ont été achetés chez Sigma, France. La pureté était de plus de 87% pour tous les produits chimiques testés qui couvraient un large champ des potentiels irritants oculaires possibles.

Préparation des produits chimiques liquides

Les produits liquides sont testés pour leur solubilité dans du tampon PBS (tampon phosphate salin) ou dans de l'huile d'olive. En résumé, 100 µl du produit à tester est mélangé à 200 µl de PBS ou d'huile d'olive. L'échantillon est mélangé sur un vortex. La turbidité et la séparation de phase éventuelle sont évaluées à l'œil. Les produits sont testés purs ou dilués à 30%. Les produits qui ne sont pas solubles dans le PBS ou l'huile d'olive ne peuvent pas être testé à 30%.

20

Protocole de traitement pour les produits liquides

La procédure d'application des produits liquides sur les tissus a été optimisée de la façon suivante : les produits chimiques sont testés à deux concentrations 100% et 30%. En résumé, la surface du tissu est humidifiée par l'addition de 20 µl de PBS à 37°C et une incubation pendant 10 mn à

37°C / 5% CO₂. Les épithéliums cornéens sont ensuite traités topiquement avec 50 ± 2 µL du produit testé (ce qui correspond à 100 µL/cm²) puis incubé pendant 10 mn à température ambiante. Les tissus sont ensuite lavés avec du
5 PBS stérile (2 X 25 ml) à 37°C. Le PBS est déposé sur le rebord de l'insert (pas directement sur le tissu) pour créer un vortex doux qui enlève le produit chimique. Les tissus sur leurs inserts sont ensuite « noyés » dans 5 ml de milieu de maintenance à température ambiante pendant 30
10 mn afin d'enlever le maximum le produit restant à la surface du tissu. Le milieu est ensuite retiré en tapotant doucement l'insert sur du papier absorbant et on ajoute 50 µl de milieu de maintenance à 37°C. Les inserts sont ensuite incubés pendant 6 hr à 37°C / 5% CO₂.

15

Protocole de traitement pour les produits solides

La procédure d'application des produits solides (en poudre) sur les tissus a été optimisée de la façon suivante. Dans un premier temps les produits sont réduits dans la poudre
20 la plus fine possible au moyen d'un mortier. Les produits chimiques sont testés à une seule dose. En résumé, la surface du tissu est humidifiée par l'addition de 20 µl de PBS à 37°C et une incubation pendant 10 mn à 37°C / 5% CO₂. Les épithéliums cornéens sont ensuite traités topiquement
25 avec 30 ± 2 mg (représentant 60 mg/cm²) puis incubé pendant 30 mn à température ambiante. Les tissus sont ensuite lavés avec du PBS stérile (2 X 25 ml) à 37°C. Le PBS est déposé sur le rebord de l'insert (pas directement sur le tissu) pour créer un vortex doux qui enlève le produit chimique.
30 Les tissus sur leurs inserts sont ensuite « noyés » dans 5 ml de milieu de maintenance à température ambiante pendant

30 mn afin d'enlever le maximum le produit restant à la surface du tissu. Le milieu est ensuite retiré en tapotant doucement l'insert sur du papier absorbant et on ajoute 50 µl de milieu de maintenance à 37°C. Les inserts sont
5 ensuite incubés pendant 6 hr à 37°C / 5% CO₂.

Purification des ARNs totaux

10

Le procédé de purification des ARNs totaux a été décrit par Cottrez et al., 2015. En résumé, les tissus de cornée sont récupérés avec des pinces et placé dans des tubes pour une congélation rapide dans de l'azote liquide. Les ARNs sont
15 ensuite extraits par la technique du Qiazol (Qiagen, Courtaboeuf, France) avec un kit « RNeasy Mini Kit » selon les instructions du fabricant. En résumé les tissus sont placés dans 1 ml de Qiazol et homogénéisés en utilisant le TissueLyser II (Qiagen, Courtaboeuf, France) avec 2 billes
20 d'acier. Après centrifugation le surnageant est recueilli et 0.2 ml de bromochloro propane (Sigma, France) sont ajoutés, puis l'ensemble est mélangé vigoureusement. L'homogénat est centrifugé à 12'000 g pendant 15 mn à 4 °C. La phase supérieure (phase aqueuse) est ajoutée à 600 µl
25 d'éthanol à 70% et immédiatement mélangée par pipetage. Le mélange est transféré dans une colonne RNeasy spin placée sur un tube de collecte de 2 ml et l'ARN est recueilli selon les instructions du fabricant (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Analyse par RT-PCR quantitative

La procédure de RT-PCR quantitative a été décrite par
5 Cottrez et al., 2015. En résumé, la transcription de l'ARN
total est réalisée avec 1 µg d'ARN total dans volume final
de 20 µl en utilisant des « Random Primers » (Invitrogen,
France) et la « SuperScript III Reverse Transcriptase »
(Invitrogen, France) selon les instructions du fabricant.
10 La RT-PCR quantitative utilise un mélange réactif de PCR :
le SYBR Green real time PCR Master Mix (ROCHE, France) avec
0.4 µM de chaque primer nucléotidique dans un volume final
de 25 µl. La réaction est réalisée dans un LC480 System
(ROCHE, France). Le programme d'amplification comprend un
15 cycle à 95°C pendant 1 mn, suivi de 40 cycles avec une
dénaturation à 95°C pendant 15s, une phase d'hybridation et
d'amplification à 60°C pendant 15s, suivi d'une phase
d'élongation finale à 72°C pendant 40s.

La quantité relative de chaque transcrit est normalisée par
20 rapport à la quantité moyenne d'expression de 5
« housekeeping » gènes (Glucuronidase β-GUSB, vacuolar
ATPase-ATP6V0E1, H2A Histone Family, Member Y- H2AFY,
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-G6PD and « non-POU domain
containing, octamer-binding »-NONO).

25

Analyse des données

Mesure de l'expression de gènes

Le taux d'expression des gènes est mesuré par une méthode d'analyse de quantification absolue par la méthode utilisant un algorithme basé sur le maximum de la dérivée seconde développé par Roche. Le taux de surexpression relative (fold increase) est ensuite calculé par rapport aux tissus traités avec du PBS seul.

Définition du modèle de prédiction du test d'irritation oculaire pour les liquides

10

L'expression de 10 gènes (i.e.: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, CCND1 (marqués par des étoiles dans la Figure 1) est mesurée dans les modèles d'épithélium cornéen après application soit d'une dose de 100% soit d'une dose de 30% du produit à tester comme indiqué plus haut. Les valeurs de surexpression significative a été fixé pour chacun des gènes à respectivement : 1.4; 1.5; 5.25; 3.6; 6.2; 1.3; 3; 2.6; 1.3 et 1.5. Chaque gène surexprimé reçoit ensuite une valeur fixe de respectivement : 2; 2; 2; 2; 1; 1; 2; 2; 1 ou 2. Un index d'irritation oculaire pour les substances liquides (LII : Liquid Irritation Index) est ensuite calculé par l'addition des valeurs attribuées à chaque gène surexprimé pour une valeur maximale de 17. Lorsque qu'après traitement des tissus par le produit testé la destruction tissulaire est jugée trop importante (l'ARN total collecté représente moins de 10% de la quantité d'ARN collectée dans les tissus traités par le PBS) on attribue une valeur de LII de 20.

Le modèle de prédiction et de classification fonctionne de la façon suivante. Chaque produit est testé à 100% et 30% (voir ci-dessus). Si LII \geq 10 à 100% et 30%, le produit testé est classé "Cat 1". Si LII \geq 10 à 100% et $<$ 10 à 30%,
5 le produit testé est classé "Cat 2". Si LII $<$ 10 à 100% et 30%, le produit testé est classé "No-Cat".

Définition du modèle de prédiction du test d'irritation oculaire pour les solides

10

L'expression de 13 gènes (i.e.: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13, MUC4 (marqués par des étoiles dans la Figure 2)) est mesurée dans les modèles d'épithélium cornéen après application
15 d'une dose de 60 mg/cm² du produit à tester comme indiqué plus haut. Les valeurs de surexpression significative a été fixé pour chacun des gènes à respectivement : 2.3 et 10 pour l'IL-24; puis pour chacun des autres gène dans l'ordre 1.9; 2; 1.4; 4; 3; 1.3; 2; 2.8 ; 4 ; 1.4 ; 1.8 et 2.5.
20 Chaque gène surexprimé (ou chaque seuil dépassé pour l'IL-24) reçoit ensuite une valeur fixe de respectivement : 1; 4; 4; 2; 1; 2; 2; 1; 4 ; 2 ; 4 ; 2 ; 3 et 4. Un index d'irritation oculaire pour les substances solides (SII : Solid Irritation Index) est ensuite calculé par l'addition
25 des valeurs attribuées à chaque gène surexprimé pour une valeur maximale de 36. Lorsque qu'après traitement des tissus par le produit testé la destruction tissulaire est jugée trop importante (l'ARN total collecté représente moins de 10% de la quantité d'ARN collectée dans les tissus
30 traités par le PBS) on attribue une valeur de SII de 40.

Le modèle de prédiction et de classification fonctionne de la façon suivante. Chaque produit est testé à 60 mg/cm² (voir ci-dessus). Si $SII \geq 20$ le produit testé est classé "Cat I". Si $10 \leq SII < 20$ le produit testé est classé "Cat 2". Si $SII < 10$ le produit testé est classé "No-Cat".

Critères d'acceptabilité pour les liquides

Deux produits chimiques « contrôle » sont testés en parallèle aux produits testés. Un non-irritant : le 1, 9-decadiene (CAS # 1647-16-1) testé à 100%, et un produit de Catégorie 2 : le 2-methyl-1-pentanol (CAS #105-30-6) testé à 100% et 30%. L'essai est considéré comme valide si les valeurs de LII obtenus pour le 1,9-decadiene testé à 100% et le 2-methyl-1-pentanol testé à 30% sont inférieures à 10 et si le LII pour le 2-methyl-1-pentanol testé à 100% est >10.

Chaque produit chimique est testé deux fois sur deux lots différents de tissu d'épithélium de cornée. Si ces deux analyses ont donné la même classification le test est considéré comme valide, sinon une troisième ou une quatrième analyse sont effectuées.

Critères d'acceptabilité pour les solides

Deux produits chimiques « contrôle » sont testés en parallèle aux produits testés. Un non-irritant : le triclobarban (cas # 101-20-2) et un produit de Catégorie 2 : le naphthalene dione (cas # 83-56-7). L'essai est considéré comme valide si la valeur de SII obtenus pour le

triclobarban est <10 et si la valeur obtenue pour le naphthalene dione est comprise entre 10 et 20.

Chaque produit chimique est testé deux fois sur deux lots différents de tissu d'épithélium de cornée. Si ces deux analyses ont donné la même classification le test est considéré comme valide, sinon une troisième ou une quatrième analyse sont effectuées.

Analyse statistique

10 Statistiques de Cooper

Les valeurs de l'analyse statistique selon Cooper (Sensibilité, Spécificité et Précision) (Cooper et al., 1979) sont calculés pour le test d'irritation oculaire en utilisant comme référence les données de la littérature pour le test de Draize (Barroso et al., 2016). Une table de contingence 2X2 avec les irritants et les non-irritants comme paramètre est construite en utilisant les résultats obtenus avec le test d'irritation oculaire. Sensibilité, Spécificité et Précision sont ensuite calculés en utilisant les préconisations de Copper . (Cooper et al., 1979).

Analyse par matrice de confusion

Pour les statistiques utilisant les matrices de confusion et le calcul du Kappa nous avons utilisé les préconisations de Landis et Koch (Landis and Koch, 1977).

Résultats

5 Sélection des gènes biomarqueurs des mécanismes d'irritation oculaire

Pour identifier les gènes impliqués dans les mécanismes d'irritation oculaire nous avons utilisé un outil d'analyse de données développés en collaboration avec Dieng-Kuntz et coll. (Dieng-Kuntz et al., 2006). Un premier groupe de 900 gène a été sélectionné. Parmi cet important groupe de gène candidat nous avons sélectionné des gènes dont l'expression est modulée dans des échantillons prélevés à la surface de l'œil humain par un dispositif de collecte d'empreintes conjonctivales (Roy et al., 2013). Puis nous avons utilisé une analyse de l'expression de gène obtenu après utilisation d'un groupe de 10 produits chimiques (Table 1 #1-10) appliqué sur le modèle de tissu Skinethic HCE, associé à une recherche par data mining de la littérature existante. Cette analyse nous a permis de définir un groupe de 92 gènes impliqués dans les mécanismes qui aboutissent à une irritation oculaire (Table 2).

25 Développement du modèle de prédiction du test d'irritation oculaire pour les liquides

La modification d'expression des 92 gènes que nous avons sélectionnés comme représentant de potentiels candidats

biomarqueurs (Table 2) a été analysée après traitement avec 39 produits chimiques (Table 1). En utilisant un sous-groupe de 29 gènes : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61 (Figure 1) il a été possible de classer les 39 produits chimiques dans l'une des 3 catégories d'irritation oculaire mises en place par le référentiel UN-GHS. Cependant, comme certains des gènes avaient un rôle redondant et pouvaient se substituer entre eux, nous avons pu sélectionner un sous-groupe de 10 gènes permettant de mettre au point un index d'irritation pour les liquides (LII) capable de discriminer les 3 catégories d'irritants. La liste des gènes sélectionnés pour les liquides inclus : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 and CCND1 (indiqués dans la Figure 1). Le LII a été élaboré en deux étapes. Nous avons tout d'abord sélectionné une valeur seuil pour chaque gène permettant de mettre en évidence une surexpression significative. Différentes valeurs de seuil ont été testées et les valeurs optimales retenues pour ces 10 gènes ont été respectivement de : 1.4; 1.5; 5.25; 3.6; 6.2; 1.3; 3; 2.6; 1.3 and 1.5. Nous avons ensuite attribué un poids à ces valeurs en fonction de l'importance de la surexpression du gène considéré dans les mécanismes d'irritation oculaire. Chaque gène surexprimé au-dessus de la valeur seuil recevait alors une valeur pondérée de respectivement : 2; 2; 2; 2; 1; 1; 2; 2; 1 et 2. Le LII est ensuite calculé en additionnant les valeurs de poids pour chacun des gènes surexprimés avec un maximum de 17. Lorsque le niveau de destruction tissulaire est jugé trop important (voir Matériels et Méthodes) une valeur de 20 est appliquée.

**Analyse des résultats obtenus par le test d'irritation
5 oculaire avec les 39 produits liquides testés.**

Les prédictions de classification obtenues avec le test
d'irritation oculaire sur les 39 produits chimiques (Table
3) ont été comparées à celles obtenues avec le test de Draize
10 dans une table de contingence 2X2 pour évaluer la
prédictivité du test à distinguer dans un premier temps les
produits irritants (Cat 1 and Cat 2) des produits non
irritants (No-Cat) (Table 4). Une spécificité, une
sensibilité et une précision de 100% ont été obtenues sur ce
15 groupe de 39 produits chimiques.

Nous avons ensuite analysé une matrice de confusion
contenant 3 classes (Cat 1, Cat 2 and No-Cat, voir Table 5)
pour calculer les performances du test à classer les
produits selon les normes UN-GHS. Une précision pour
20 l'utilisateur de 91.66%, 93.33% and 100% a été obtenue pour
respectivement les produits classés Cat 1, Cat 2 et No-Cat.
Avec une précision générale de 95% et un kappa hautement
significatif de 0.923.

Ces résultats montrent que le test d'irritation oculaire
25 est très efficace pour classer le potentiel d'irritation
oculaire des produits chimiques liquides dans les 3 classes
définies par le référentiel UN-GHS.

Développement du modèle de prédiction du test d'irritation oculaire pour les solides

Pour les solides nous avons testé 15 produits chimiques (Table 6). En utilisant le même groupe de 29 gènes : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61 (Figure 2) il a été possible de classer les 15 produits chimiques dans l'une des 3 catégories d'irritation oculaire mises en place par le référentiel UN-GHS. Cependant, comme certains des gènes avaient un rôle redondant et pouvaient se substituer entre eux, nous avons pu sélectionner un sous-groupe de 13 gènes permettant de mettre au point un index d'irritation pour les solides (SII) capable de discriminer les 3 catégories d'irritants. La liste des gènes sélectionnés pour les solides inclut : (IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13, MUC4. Figure 2). Le SII a été élaboré en deux étapes. Nous avons tout d'abord sélectionné une valeur seuil pour chaque gène permettant de mettre en évidence une surexpression significative. Différentes valeurs de seuil ont été testées et les valeurs optimales retenues pour ces 13 gènes ont été respectivement de 2.3 et 10 pour l'IL-24; puis pour chacun des autres gènes dans l'ordre 1.9; 2; 1.4; 4; 3; 1.3; 2; 2.8 ; 4 ; 1.4 ; 1.8 et 2.5. Nous avons ensuite attribué un poids à ces valeurs en fonction de l'importance de la surexpression du gène considéré dans les mécanismes d'irritation oculaire. Chaque gène surexprimé au-dessus de la valeur seuil recevait alors une valeur pondérée de respectivement : 1; 4; 4; 2; 1; 2; 2; 1; 4 ; 2 ; 4 ; 2 ; 3

et 4. Le SII est ensuite calculé en additionnant les valeurs de poids pour chacun des gènes surexprimés avec un maximum de 36. Lorsque le niveau de destruction tissulaire et jugé trop important (voir Matériels et Méthodes) une
5 valeur de 40 est appliquée.

Analyse des résultats obtenus par le test d'irritation oculaire avec les 15 produits solides testés.

Les prédictions de classification obtenues avec les tests
10 d'irritation oculaire sur les 15 produits chimiques solides (Table 7) ont été comparées à celles obtenues avec le test de Draize dans une table de contingence 2X2 pour évaluer la prédictivité du test à distinguer dans un premier temps les produits irritants (Cat 1 and Cat 2) des produits non
15 irritants (No-Cat) (Table 8). Une spécificité, une sensibilité et une précision de 100% ont été obtenues sur ce groupe de 15 produits chimiques.

Nous avons ensuite analysé une matrice de confusion contenant 3 classes (Cat 1, Cat 2 and No-Cat, voir Table 9)
20 pour calculer les performances du test à classer les produits selon les normes UN-GHS. Une précision pour l'utilisateur de 100% a été obtenue pour les produits classés Cat 1, Cat 2 et No-Cat. Avec une précision générale de 100% et un kappa parfaitement significatif de 1.

25 Ces résultats montrent que le test d'irritation oculaire est très efficace pour classer le potentiel d'irritation oculaire des produits chimiques dans les 3 classes définies par le référentiel UN-GHS.

Légende des figures

Figure 1 A, B, C, D: Analyse d'expression génique dans le tissu cornéal humain reconstruit en 3D traité avec différents produits chimiques liquides irritants et non irritants.

La valeur du taux de surexpression (fold increase) pour les 29 gènes indiqués a été représentée pour 4 produits chimiques de catégorie 1 (barre noires, dans l'ordre de gauche à droite acide lactique, methyl thioglycolate, sodium lauryl sulfate (15%), Benzalkonium choride (10%)), 4 produits chimiques de catégorie 2 (barres grises, dans l'ordre de gauche à droite alpha hexyl cinnamaldehyde, acetone, methyl ethyl ketone, 3-chloro propane nitrile) et 4 produits non classés (No category, barres blanches dans l'ordre de gauche à droite : 1,9 decadiene, Glycerol, Tween 20, 2,4 pentanediol). Chaque produit chimique a été appliqué à 100% (A et B) ou dilué à 30% (C et D). Les gènes utilisés pour l'exemple sont HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 and CCND1.

20

Figure 2 A et B : Analyse d'expression géniques dans le tissu cornéal humain reconstruit en 3D traité avec différents produits chimiques solides irritants et non irritants.

La valeur du taux de surexpression (fold increase) pour les 29 gènes indiqués a été représentée pour 5 produits chimiques de catégorie 1 (barre noires, dans l'ordre de gauche à droite, 2 hydroxyisobutyric acide, Hydrochloride de Promethazine, Sodium oxalate, 2,5-dimethyl heanediol, 1-naphthalene acetic acide), 2 produits chimiques de

30

catégorie 2 (barres grises dans l'ordre de gauche à droite, Naphthalene diol, Camphene) et 8 produits non classés (No category, barres blanches dans l'ordre de gauche à droite Triclocarban, Methylenebis benzotriazol tetramethylbutyl phenol, Pyrimetranyl, Myristil myristate, 4,4' Methylene bis-(2,6-di-tert-butylphenol), 4-bromophenetol, Potassium tetrafluoroborate). Chaque produit chimique a été appliqué à pur en poudre (30 ± 2 mg (représentant 60 mg/cm²)). Les gènes sélectionnés pour l'exemple sont IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13, MUC4.

Table 1 : Liste des produits liquides étudiés

N°	Chemical	CAS RN	UN GHS
1	Triton X100 10%	9002- 93-1	Cat 1
2	Triton X100 5%	9002- 93-1	Cat 2A
3	Triton X100 1%	9002- 93-1	No Cat
4	Sodium lauryl sulphate 3%	151-21- 3	No Cat
5	Methyl ethyl ketone	78-93-3	Cat 2A
6	Acetone 100%	67-64-1	Cat 2A
7	Lactic acid	50-21-5	Cat 1
8	Chlorexhidine 50%	55-56-1	Cat 1
9	Benzalkonium chloride 5%	8001- 54-5	Cat 1
10	Hexadecyltrimethylammonium bromide 10%	57-09-0	Cat 1

11	Triton X-100 10%	9002- 93-1	Cat 1
12	Benzethonium chloride 10%	121-54- 0	Cat 1
13	Methyl thioglycolate	2365- 48-2	Cat 1
14	Diethylaminopropionitrile	5351- 04-2	Cat 1
15	Tetraethylene glycol diacrylate	17831- 71-9	Cat 1
16	1-Chlorooctan-8-ol	23144- 52-7	Cat 1
17	[3-(2-Aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane	1760- 24-3	cat 1
18	Sodium hydroxyde 0,3%	1310- 73-2	Cat 2A
19	2, 6-dichlorobenzoyl chloride	4659- 45-4	Cat 2A
20	Gammabutyrolactone	96-48-0	Cat 2A
21	Allyl alcohol	107-18- 6	Cat 2A
22	Chlorhexidine gluconate (20%)	18472- 51-0	Cat 2A
23	Propasol Solvent P	1569- 01-3	Cat 2A

24	2-methyl-1-pentanol	105-30-6	Cat 2B
25	iso-Butanal	78-84-2	Cat 2B
26	3-Chloropropionitrile	542-76-7	Cat 2B
27	Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	Cat 2B
28	Glycolic acid (10%)	79-14-1	Cat 2B
29	diethyl toluamide	134-62-3	Cat 2B
30	Glycerol	56-81-5	No Cat
31	Tween 20	9005-64-5	No Cat
32	octyltrimethoxysilane (SILAN 108)	3069-40-7	No Cat
33	1, 9-decadiene	1647-16-1	No Cat
34	2,4-Pentanediol	625-69-4	No Cat
35	2-Ethoxyethyl methacrylate	2370-63-0	No Cat
36	dipropyl disulphide	629-19-6	No Cat

37	n-Hexyl bromide	111-25-1	No Cat
38	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil (Kolliphor)	61788-85-0	No Cat
39	1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate	342573-75-5	No Cat

Table 2 : Liste des gènes analysés par RT-PCR

SYMBOLE	DESCRIPTION	Fonction	REFSEQ
ALB	Albumin	protéine majeure de la cornée	NM_000477
ATP6V0E1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1	Impliqué dans phosphorylation oxydative et phagosome	NM_003945.3
B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	Requise pour la biosynthèse de glycophospholipides. plus exprimé dans la cornée que les autres membres de la famille.	NM_004775
CASP1	caspase 1, apoptosis-related	Activation de IL-1.	NM_033292

	cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)		
CCL22	chemokine (C- C motif) liGand 22	Ligand de CCR4 ; impliqué dans le transit des cellules T.	NM_002990.3
CCND1	cyclin D1	Régulateur positif du cycle cellulaire	NM_053056
CCNF	cyclin F	Régulateur du cycle cellulaire	NM_001761.2
CCS	copper chaperone for superoxide dismutase	Delivre le Cuivre à la zinc superoxide dismutase Cuivre dépendante (SOD1)	NM_005125
CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	Récepteur endocytaire. Impliqué dans le traitement des antigènes.	NM_080387.4
COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1	Joue un rôle dans l'attachement des kératinocytes basals à la membrane basale.	NM_000494
COL6A2	collagen type	Joue le rôle de protéine de liaison	NM_001849.3

	VI alpha 2	cellulaire	
COL7A1	collagen, type VII, alpha 1	Protéine de membrane de l'épithélium squameux stratifié.	NM_000094
COL8A2	collagen, type VIII, alpha 2	Composant majeur de la membrane de Descemet des cellules endothéliales cornéales. Marqueurs des cellules endothéliales cornéales humaines.	NM_005202.2
CRYAB	crystallin, alpha B	Susceptible de contribuer à la transparence et à l'index de réfraction de la lentille	NM_001885
CSF2	colony stimulating factor 2 (Granulocyte- macrophage)	Facteur de croissance des cellules hématopoïétiques	NM_000758.2
CTGF	connective tissue Growth factor	Tissu connectif micro attractif majeur sécrété par les cellules endothéliales	NM_001901.2

		vasculaires.	
CTSZ	cathepsin Z	Cystéine protéinase impliquée dans la dégradation protéique lysosomale et extra-cellulaire	NM_001336.2
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) liGand 1 (melanoma Growth stimulating activity, alpha)	Dispose d'une activité chimiotactique pour les neutrophiles.	NM_001511.1
CXCL9	chemokine (C-X-C motif) liGand 9	Dispose d'une activité chimiotactique pour les cellules T. se lie au CXCR3	NM_002416.1
CXCR1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	Récepteur de l'interleukin-8, facteur chimiotactique des neutrophiles.	NM_000634.2
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Impliqué dans la néo vascularisation de la cornée	NM_001554.4
CYR1	cysteine/tyro	Marqueur spécifique	NM_052954.2

	sine-rich 1	des cellules endothéliales cornéales humaines.	
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	Marqueur d'apoptose	NM_004083.4
DEFB1	defensin, beta 1	Impliqué dans la défense mucoale contre l'agression	NM_005218
DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	Ligand non canonique impliqué dans le développement des tissus	NM_003836
DUOX2	Dual oxidase 2	Membre de la famille des NADPH oxydase	NM_014080
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	Cible la famille des ERK et joue un rôle dans la prolifération des cellules cornéales.	NM_001946.2
ELN	elastin	Protéine majeure de structure des tissus.	NM_000501.2
ESR1	estrogen receptor 1	Récepteur nucléaire hormonal. Affecte la prolifération cellulaire et la différenciation des	NM_000125

		tissus cible.	
FBN1	fibrillin 1	Fibrillines sont des composants structuraux parfois associés à l'élastine.	NM_000138
FBN2	fibrillin 2	Fibrillines sont des composants structuraux parfois associés à l'élastine	NM_001999
FDXR	ferredoxin reductase	flavoprotéine mitochondriale qui initie le transport d'électron pour les cytochromes P450 recevant des électrons du NADPH	NM_004110.3
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	Facteur de croissance et agent angiogénique.	NM_002006
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	Récepteur pour facteurs de croissance de fibroblaste (FGF1 et FGF2)	NM_015850
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral	Phosphoprotéine nucléaire formant un complexe fort mais	NM_005252

	oncogene homolog	non covalent avec le facteur de transcription JUN/AP-1.	
FOXO1	forkhead box 01	Facteur de Transcription impliqué dans les voies métaboliques de l'insuline	NM_002015
FSHR	follicle stimulating hormone receptor	Receptor for follicle-stimulating hormone (FSH).	NM_000145
FST	follistatin	Inhibiteur de FSH	NM_013409.2
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydroGenase	Produit des pentoses pour la synthèse d'acides nucléiques et principal producteur de pouvoir réducteur NADPH	NM_000402
GAA	Glucosidase, alpha; acid	Essentiel pour la dégradation du glycogène en glucose dans les lysosomes.	NM_000152.3
GSTT1	Glutathione S-transferase theta 1	Conjugaison du glutathionne réduit avec de nombreux composes	NM_000853.2

		électrophiles exogènes et endogènes.	
GUSB	glucuronidase , beta	Rôle important dans la dégradation des dermatan sulfates et des keratan sulfates.	NM_000181
H2AFY	H2A histone family, member Y	Variant de l'histone H2A remplaçant la H2A conventionnelle dans un sous-groupe de nucléosomes là où il réprime la transcription.	NM_138610.2
HAS1	hyaluronan synthase 1	Joue un rôle dans la synthèse de hyaluronan et d'acide hyaluronique.	NM_001523
HSP90AA 1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	Chaperonne moléculaire qui promeut la maturation, le maintien, la structure et la régulation de protéines cible spécifiques	NM_005348

		impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et le signal de transduction	
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	Hsp70s stabilise les protéines contre l'agrégation et aide au repliement des nouveaux peptides traduits dans le cytosol et dans les organelles.	NM_005345
ICAM2	intercellular adhesion molecule 2	ICAM sont les ligands pour l'adhésion des protéines LFA-1 aux leucocytes.	NM_001099789 .1
IER3	immediate early response 3	Peut jouer un rôle dans le signal ERK en inhibant la déphosphorylation de ERK par la phosphatase PP2A-PPP2R5C holoenzyme	NM_003897.3
IGFBP2	insulin-like Growth factor binding protein 2, 36kDa	Inhibe le développement et la croissance médiés par l'IGF.	NM_000597.2

IL-17C	interleukin 17C	Stimule la libération du facteur de nécrose tumoral alpha et IL-1beta de la lignée cellulaire monocytique THO-1.	NM_013278
IL-1 R2	interleukin 1 receptor, type II	Récepteur de l'interleukine-1 alpha (IL-1A), beta (IL-1B) et de la protéine antagoniste du récepteur interleukine-a (IL-1ra).	NM_173343.1
IL-23R	interleukin 23 receptor	S'associe à IL12RB1 pour former le récepteur interleukine-23.	NM_144701.2
IL-24	interleukin 24	Rôle dans la cicatrisation	NM_181339.1
IRF1	interferon regulatory factor 1	Se lie spécifiquement à la région amont régulatrice des gènes de type I IFN et IFN du CMH et active ces gènes.	NM_002198
ITGA6	integrin,	Integrine alpha-6/beta-4 est un	NM_000210.2

	alpha 6	récepteur de laminine dans les cellules épithéliales et joue un rôle critique structural dans l'hémidesmosome.	
ITGA7	integrin, alpha 7	Integrine alpha-7/beta-1 est le récepteur primaire de laminine au niveau des myoblastes squelettiques et des myofibres adultes.	NM_002206
JUN	jun proto-oncogene	Facteur de transcription qui reconnaît et se lie au motif heptamer 5'-TGA[CG]TCA-3'	NM_002228
KL	klotho	Impliqué dans les processus de vieillissement	NM_004795
KRT1	keratin 1	membre de la famille des kératines	NM_006121.3
KRT14	keratin 14	membre de la famille des kératines	NM_000526.4
KRT15	keratin 15	membre de la famille des kératines	NM_002275.3

KRT17	keratin 17	membre de la famille des kératines	NM_000422.2
KRT19	keratin 19	membre de la famille des kératines	NM_002276.4
KRT3	keratin 3	membre de la famille des kératines	NM_057088.2
KRT5	keratin 5	membre de la famille des kératines	NM_000424
KRT9	keratin 9	membre de la famille des kératines	NM_000226.2
MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	Peut dégrader la fibronectine, les gélatines de type I, III, IV et V.	NM_002425.1
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase)	Dégrade le collagène de type I. pas d'action sur gélatine ou caséine.	NM_002127.2
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, proGelatinase)	Dégrade fibronectine, laminine, gélatines de type I, III, IV, and V; collagènes III, IV, X, and IX, et protéoglycanes du cartilage.	NM_002422.3
MMP8	matrix	Dégrade les	NM_002424.2

	metallopeptidase 8 (neutrophil collaGenase)	collagènes fibrillaires de type I, II et III.	
MSN	moesin	Impliqué dans les connexions des structures cytosquelettiques majeurs de la membrane plasmatique.	NM_002444.2
MSRA	Methionine sulfoxide reductase A	Fonctionne comme enzyme de réparation des protéines inactivées par l'oxydation.	NM_012331
MUC1	mucin 1, cell surface associated	Exprimée par cellules apicales et joue rôle dans le film lacrymal	NM_001204285 .1
MUC13	mucin 13, cell surface associated	Exprimée par cellules apicales et joue rôle dans le film lacrymal	NM_033049
MUC16	mucin 16, cell surface associated	Exprimée par cellules apicales et joue rôle dans le film lacrymal	NM_024690

MUC4	mucin 4, cell surface associated	Exprimée par cellules apicales et joue rôle dans le film lacrymal	NM_018406
MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	Protéine impliquée dans les voies de signalisation du récepteur Toll-like et IL-1	NM_001172569.1
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding	Protéines de liaison à l'AND et ARN ; impliquée dans de nombreux processus nucléaires.	NM_007363
NOS3	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	Produit du NO impliqué dans la relaxation vasculaire du muscle lisse.	NM_000603
OCLN	occludin	Rôle dans la formation et la régulation des jonctions forte , barrière paracellulaire de perméabilité.	NM_002538.3
PER1	period homolog 1	Composant du mécanisme circadien	NM_002616

	(Drosophila)	essentiel pour la génération des rythmes circadiens.	
RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)	Récepteur multiubiquitine impliqué dans la modulation de la dégradation par protéasome	NM_005053
S100A4	S100 calcium binding protein A4	-	NM_002961.2
SIRT6	sirtuin 6	Déacétylase NAD- dépendante. Module l'acétylation des histones H3 au niveau de la chromatine télomérique Durant la phase S du cycle cellulaire.	NM_016539
SIRT7	sirtuin 7	Deacetylase NAD- dépendante. Requisite pour restaurer la transcription de l'ARNr à la sortie de la mitose.	NM_016538
SLC4A11	solute carrier family 4,	Transporteur jouant un rôle important dans le	NM_001174090 .1

	sodium borate transporter, member 11	transport de fluide médié par le sodium dans différents organes. Prévient les modifications morphologiques graves causées par une augmentation des concentrations de NaCl dans le stroma.	
SLIT2	slit homolog 2 (Drosophila)	Agit comme guide moléculaire dans la migration cellulaire et semble modulé par l'interaction avec récepteurs homologues.	NM_004787
SNN	stannin	Joue un rôle dans les effets toxiques des organotines.	NM_003498
STK25	serine/threonine kinase 25	Serine/thréonine kinase oxydante activée par le stress susceptible de jouer un rôle dans la réponse au stress	NM_006374.3

		environnemental. .	
THBS1	thrombospondin 1	Glycoprotein adhésive médiant les interactions cellules-cellules et cellules-matrices. Se lie à l'Héparine. .	NM_003246
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Enzyme d'édition dépendante de l'ubiquitine contenant des activités ubiquitine-ligase et deubiquitinase.	NM_006290.2
TPSAB1	tryptase alpha/beta 1	La tryptase est une protéase majeure présente dans les cellules mastocytes et sécrétée lors de la réponse par la dégranulation/activation de ce type de cellules.	NM_003294.3

Table 3: Résultats de l'analyse des 39 produits liquides testés par le test d'irritation oculaire (TIO) et comparaison avec les résultats obtenus par le test de Draize

N°	Chemical	CAS RN	Irritation INDEX		100%	TIO prediction	UN-GHS
					30%		
1	Triton X100 10%	9002-93-1	13	15	-	Cat 1	Cat 1
			12	13	-		
2	Triton X100 5%	9002-93-1	12	13	-	Cat 2	Cat 2A
			6	8	-		
3	Triton X100 1%	9002-93-1	8	7	-	No Cat	No Cat
			5	4	-		
4	Sodium lauryl sulphate 3%	151-21-3	9	7	-	No Cat	No Cat
			9	7	-		
5	Methyl ethyl ketone	78-93-3	12	11	-	Cat 2	Cat 2A
			8	7	-		
6	Acetone 100%	67-64-1	12	13	-	Cat 2	Cat 2A
			8	9	-		
7	Lactic acid	50-21-5	13	14	-	Cat 1	Cat 1

			11	11	-		
8	Chlorexhidine	55-56-1	13	14	-	Cat 1	Cat 1
			12	11	-		
9	Benzalkonium chloride 5%	8001-54-5	14	17	-	Cat 1	Cat 1
			12	11	-		
10	Hexadecyltrimethylammonium bromide 6%	57-09-0	13	15	-	Cat 1	Cat 1
			12	13	-		
11	Triton X-100 10%	9002-93-1	16	17	-	Cat 1	Cat 1
			11	12	-		
12	Benzethonium chloride 10%	121-54-0	12	14	-	Cat 1	Cat 1
			12	12	-		
13	Methylthioglycolate	2365-48-2	16	17	-	Cat 1	Cat 1
			15	14	-		
14	Diethylaminopropionitrile	5351-04-2	15	14	-	Cat 1	Cat 1
			15	12	-		
15	Tetraethylene glycol diacrylate	17831-71-9	11	11	-	Cat 2	Cat 1
			7	4	-		
16	1-Chlorooctan-	23144-52-7	17	15	-	Cat 1	Cat 1
			13	11	-		

	8-ol						
17	[3-(2-Aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane	1760-24-3	12	16	-	Cat 1	cat 1
			15	14	-		
18	Sodium hydroxyde 0,3%	1310-73-2	12	17	-	Cat 2	Cat 2A
			5	3	-		
19	2,6-dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	17	15	-	Cat 2	Cat 2A
			8	8	-		
20	Gammabutyrolactone	96-48-0	17	16	-	Cat 2	Cat 2A
			8	8	-		
21	Allyl alcohol	107-18-6	17	15	-	Cat 2	Cat 2A
			8	7	-		
22	Chlorhexidine gluconate (20%)	18472-51-0	12	13	-	Cat 2	Cat 2A
			5	5	-		
23	Propasol Solvent P	1569-01-3	15	17	-	Cat 1	Cat 2A
			16	17	-		
24	2-methyl-1-pentanol	105-30-6	15	15	-	Cat 2	Cat 2B
			8	6	-		
25	iso-Butanal	78-84-2	15	20	-	Cat 2	Cat 2B
			6	8	-		

26	3-Chloropropionitrile	542-76-7	16	11	-	Cat 2	Cat 2B
			8	7	-		
27	Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	12	9	13	Cat 2*	Cat 2B
			6	8	7		
28	Glycolic acid (10%)	79-14-1	17	13	-	Cat 2	Cat 2B
			8	9	-		
29	diethyltoluamide	134-62-3	17	17	-	Cat 2	Cat 2B
			9	8	-		
30	Glycerol	56-81-5	0	0	-	No Cat	No Cat
			0	0	-		
31	Tween 20	9005-64-5	2	0	-	No Cat	No Cat
			0	0	-		
32	octyltrimethoxysilane (SILAN 108)	3069-40-7	6	10	8	No Cat*	No Cat
			0	3	2		
33	1,9-decadiene	1647-16-1	7	4	-	No Cat	No Cat
			0	0	-		
34	2,4-Pentandiol	625-69-4	9	7	-	No Cat	No Cat
			6	2	-		

35	2-Ethoxyethyl methacrylate	2370-63-0	9	7	-	No Cat	No Cat
			4	3	-		
36	dipropyl disulphide	629-19-6	7	5	-	No Cat	No Cat
			6	4	-		
37	n-Hexyl bromide	111-25-1	8	10	6	No Cat*	No Cat
			6	4	3		
38	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil (Kolliphor)	61788-85-0	7	4	-	No Cat	No Cat
			4	0	-		
39	1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate	342573-75-5	9	10	5	No Cat*	No Cat
			5	5	3		

5 Table 4: Mesure de la capacité de prédiction du test d'irritation oculaire pour différencier les irritants oculaires (classés comme Cat 1 ou Cat 2) des non irritants (no Cat) sur un set de 39 produits chimiques

DRAIZE	Classés	No Categorie
Classés (n)	27	0
No Categorie (n)	0	12
Total (n)	27	12
Sensitivité (%)	100	
Specificité (%)	100	
Précision (%)	100	

Table 5 : Analyse par matrice de confusion de la capacité de prédiction du test d'irritation oculaire à séparer entre 3 classes d'irritation (Cat 1, Cat 2 and no Cat) selon les recommandations UN-GHS.

		Test d'irritation oculaire			Classification Overall	Producer accuracy (Precision)
		Cat 1	Cat 2	No Cat		
UNGHS	Cat 1	11	1		12	91.66%
	Cat 2	1	14		15	93.33%
	No Cat			12	12	100%
	Truth Overall	12	15	12	39	
	User accuracy (Recall)	91.66%	93.33%	100%		
Overall Accuracy	95%					
Kappa	0.923					

5

Table 6 : Liste des produits chimiques solides étudiés

CAS Number	Nom CHIMIQUE	GHS Classe
594-61-6	alpha-Hydroxyisobutyric acid [2-Hydroxyisobutyric acid]	Cat 1
58-33-3	Promethazine Hydrochloride	Cat 1
79-92-5	Camphene	Cat 2B
62-76-0	Sodium oxalate	Cat 1
110-03-2	2,5-Dimethylhexanediol	Cat 1
86-87-3	1-Naphthalene acetic acid	Cat 1
83-56-7	1,5-naphthalenediol INCI name: 1,5-NAPHTHALENE DIOL	Cat 2A
101-20-2	1-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea INCI name: TRICLOCARBAN	no cat
103597-45-1	2,2'-methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol) INCI name: METHYLENE BIS-BENZOTRIAZOLYL TETRAMETHYLBUTYLPHENOL	no cat

53112-28-0	2-anilino-4,6-dimethylpyrimidine common name: Pyrimethanil	no cat
3234-85-3	tetradecyl tetradecanoate INCI name: Myristyl myristate	No cat
118-82-1	4,4'-Methylene bis-(2,6-di-tert-butylphenol)	No cat
589-10-6	4-Bromophenetol	No cat
14075-53-7	Potassium tetrafluoroborate	No cat
21645-51-2	Aluminum hydroxyde	No cat

Table 7: Résultats de l'analyse des 15 produits solides testés par le test d'irritation oculaire (TIO) et comparaison avec les résultats obtenus par le test de Draize

N°	Nom chimique	CAS RN	Irritation INDEX			TIO prediction	UN-GHS
1	2-Hydroxyisobutyric acid	594-61-6	34	28	32	Cat 1	Cat 1
2	Promethazine Hydrochloride	58-33-3	34	32	30	Cat 1	Cat 1
3	Camphene	79-92-5	10	12	13	Cat 2	Cat 2B
4	Sodium oxalate	62-76-0	22	24	32	Cat 1	Cat 1
5	2,5-Dimethylhexanediol	110-03-2	22	23	21	Cat 1	Cat 1
6	1-Naphthalene acetic acid	86-87-3	26	28	25	Cat 1	Cat 1
7	1,5-Naphthalenediol	83-56-7	12	18	15	Cat 2	Cat 2A
8	Triclocarban	101-20-2	0	0	1	No Cat	No Cat
9	Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutyl phenol	103597-45-1	2	4	3	No Cat	No Cat

1 0	Pyrimethanil	53112-28-0	0	0	0	No Cat	No Cat
1 1	Myristyl myristate	3234-85-3	2	3	1	No Cat	No Cat
1 2	4,4'-Methylene bis-(2,6-di- tert- butylphenol)	118-82-1	3	0	0	No Cat	No Cat
1 3	4-Bromophenetol	589-10-6	2	2	3	No Cat	No Cat
1 4	Potassium tetrafluoroborat e	14075-53-7	4	6	2	No Cat	No Cat
1 5	Aluminum hydroxyde	21645-51-2	0	0	0	No Cat	No Cat

5 Table 8: Mesure de la capacité de prédiction du test d'irritation oculaire pour différencier les irritants oculaires (classés comme Cat 1 ou Cat 2) des non irritants (no Cat) sur un set de 15 produits chimiques solides

DRAIZE	Classés	No Categorie
Classés (n)	7	0
No Categorie (n)	0	8

Total (n)	7	8
Sensitivité (%)	100	
Spécificité (%)	100	
Précision (%)	100	

Table 9 : Analyse par matrice de confusion de la capacité de prédiction du test d'irritation oculaire à séparer entre 3 classes d'irritation (Cat 1, Cat 2 and no Cat) selon les recommandations UN-GHS des 15 produits solides.

5

		Test d'irritation oculaire			Classi- fication	« Producer accuracy » (Précision)
		Cat 1	Cat 2	No Cat		
UNGHS	Cat 1	5			5	100%
	Cat 2		2		2	100%
	No Cat			8	8	100%
	« Truth Overall »	5	2	8	15	
	« User accuracy » (Recall)	100%	100%	100%		
« Overall Accuracy »	100%					
Kappa	1					

10

REVENDEICATIONS

1. Méthode d'évaluation du potentiel d'irritation oculaire d'un composé test, comprenant les étapes de:
 - a) mise en contact d'un composé test avec un échantillon cornéal reconstruit in vitro;
 - b) mesure de l'expression d'au moins deux gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous la forme solide et dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins deux gènes choisis dans le groupe constitué par : IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 et MUC4.

3. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mise en contact du composé test à l'étape a) est réalisée avec le composé test sous la forme liquide et dans laquelle l'étape b) comprend la mesure de l'expression d'au moins deux gènes choisis dans le groupe constitué par : HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 et CCND1.

4. Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape supplémentaire c) de détermination d'un index d'irritation oculaire d'un composé test.

5. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d) de catégorisation dudit composé comme présentant un potentiel d'irritation oculaire selon la valeur de l'index d'irritation oculaire obtenu.

6. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en que l'échantillon cornéal reconstruit in vitro est un échantillon comprenant des cellules épithéliales de cornée immortalisées, cultivées en milieu de culture défini et disposées en couche fine sur une membrane synthétique à l'interface eau-air.
7. Méthode selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que la détermination de l'index d'irritation oculaire du composé comprend l'attribution d'une valeur seuil de surexpression à chaque gène dont l'expression est mesurée.
8. Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que la valeur seuil indiquant une surexpression significative du gène dont l'expression est mesurée peut être comprise en 1,1 et 10.
9. Méthode selon l'une des revendications 7 ou 8 caractérisée en ce que la détermination de l'index d'irritation oculaire comprend l'attribution d'une valeur de poids à chaque gène si la valeur seuil de surexpression dudit gène est atteinte.
10. Méthode selon la revendication 9 caractérisée en ce que la valeur de poids est choisie dans le groupe de valeurs discrètes échelonnées entre 1 et 10, à savoir choisies dans le groupe consistant en les valeurs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10.
11. Méthode selon la revendication 9 ou 10 caractérisée en ce que l'index d'irritation oculaire est déterminé par l'addition des valeurs de poids des gènes dont l'expression dépasse la valeur seuil de surexpression.
12. Méthode selon l'une des revendications 5 à 11, caractérisée en ce que l'étape de catégorisation comprend l'attribution d'une catégorie d'irritation au composé test en fonction de la valeur de l'index d'irritation oculaire obtenu.

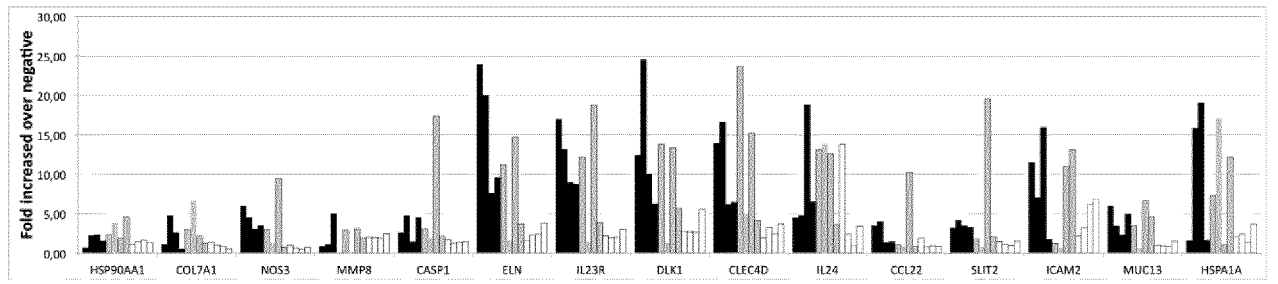
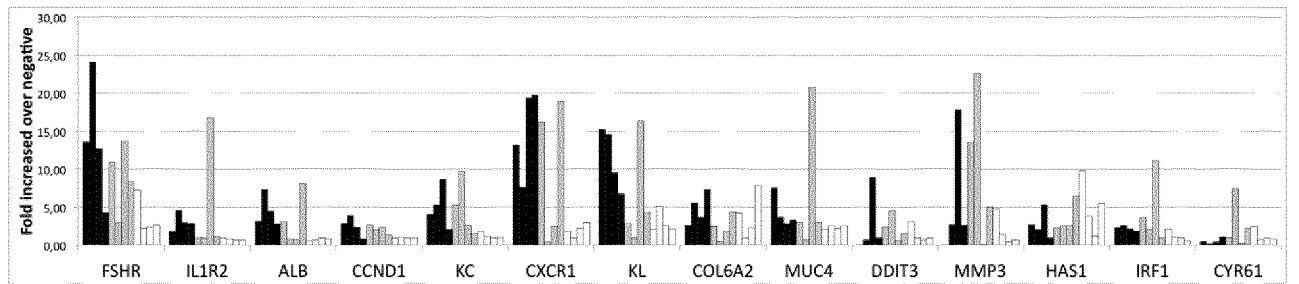
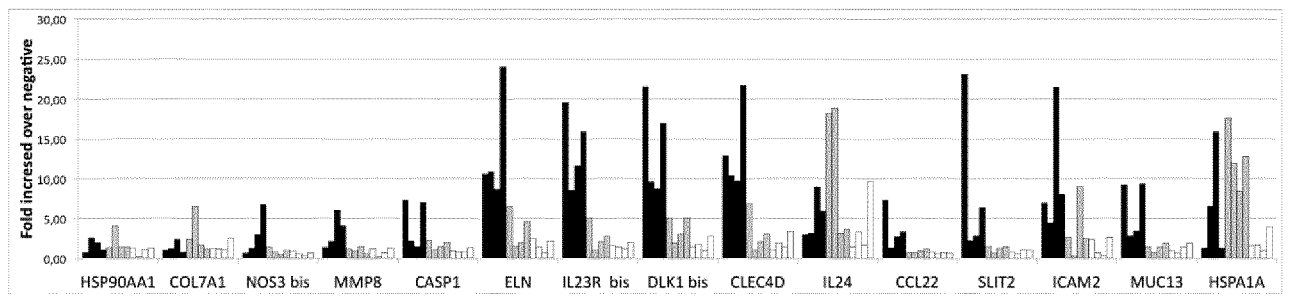
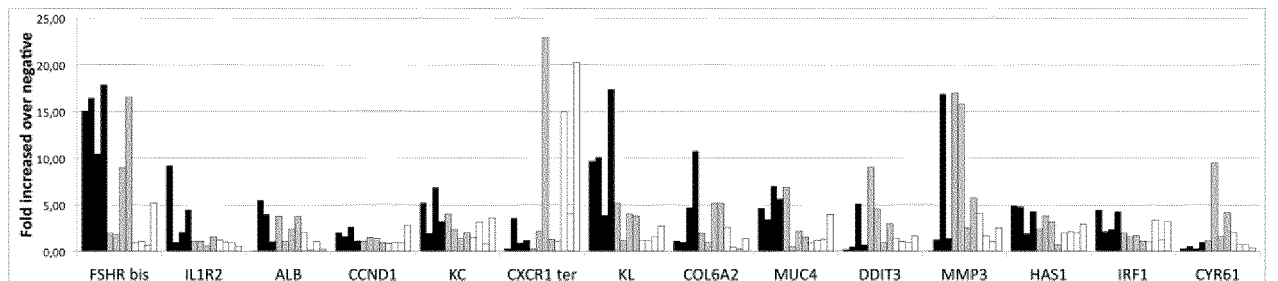
A**B****C****D**

FIGURE 1

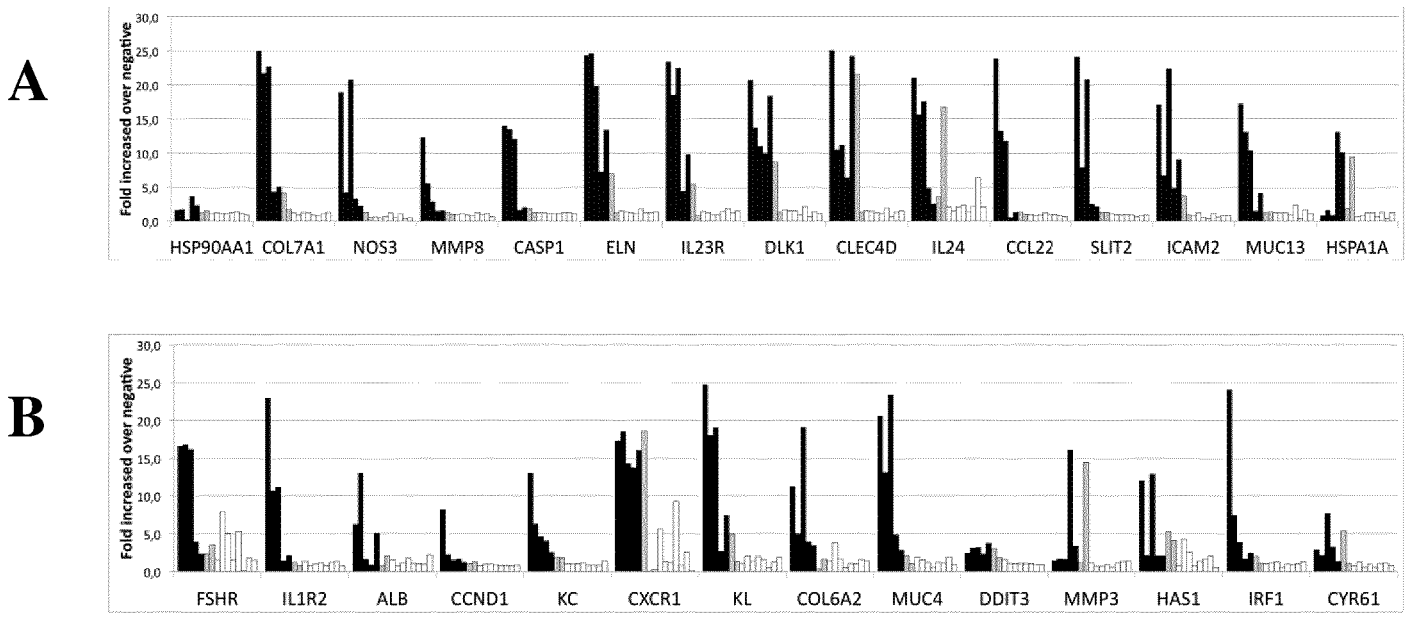


FIGURE 2

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

YAMAMOTO NAOKI ET AL: "Establishment of a new immortalized human corneal epithelial cell line (iHCE-NY1) for use in evaluating eye irritancy by in vitro test methods", IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY. ANIMAL, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 52, no. 7, 29 avril 2016 (2016-04-29) , pages 742-748, XP036030366, ISSN: 1071-2690, DOI: 10.1007/S11626-016-0038-9 [extrait le 2016-04-29]

RÖNKKÖ SEPPÖ ET AL: "Human corneal cell culture models for drug toxicity studies", DRUG DELIVERY AND TRANSLATIONAL RESEARCH, SPRINGER, GERMANY, vol. 6, no. 6, 9 septembre 2016 (2016-09-09), pages 660-675, XP036092774, ISSN: 2190-393X, DOI: 10.1007/S13346-016-0330-Y [extrait le 2016-09-09]

KHOH-REITER SU ET AL: "Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model", BMC OPHTHALMOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 9, no. 1, 28 juillet 2009 (2009-07-28), page 5, XP021057710, ISSN: 1471-2415, DOI: 10.1186/1471-2415-9-5

MELONI M ET AL: "Occludin gene expression as an early in vitro sign for mild eye irritation assessment", TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 24, no. 1, 1 février 2010 (2010-02-01), pages 276-285, XP026812650, ISSN: 0887-2333 [extrait le 2009-09-01]

FR 2 957 090 A1 (IMMUNOSEARCH [FR]) 9 septembre 2011 (2011-09-09)

CA 2 318 641 A1 (UNIV OTTAWA [CA]; UNIV TENNESSEE RES CORP [US]; UNIV LAVAL [CA]) 29 juillet 1999 (1999-07-29)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT