



**Section 4**  
Effets sur la santé

## Ligne directrice n° 496

Méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro*  
pour l'identification de produits chimiques  
provoquant des lésions oculaires  
graves et les produits chimiques ne  
relevant d'aucune classification  
pour irritation oculaire ou lésions  
oculaires graves

25 juin 2024

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



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

## Méthodes d'essai macromoléculaires *in vitro* pour l'identification du potentiel de danger oculaire des produits chimiques

### INTRODUCTION

1. Les méthodes d'essai macromoléculaires *in vitro* Ocular Irritation (OI®) et OptiSafe Eye Irritation Test™ (OS) sont des méthodes biochimiques acellulaires *in vitro* qui peuvent être utilisées pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave. À l'heure actuelle, seule la méthode OI® peut être utilisée pour identifier les produits chimiques qui sont susceptibles d'induire des lésions oculaires graves.

2. Les méthodes décrites dans la présente Ligne directrice ne peuvent pas être utilisées toutes seules pour remplacer le test de Draize *in vivo* pour prédire la gamme complète de potentiel irritant et les aspects mécaniques pour les différentes classes de produits chimiques. Il est recommandé de recourir à d'autres stratégies d'essai telles que celles décrites dans les Lignes directrices 467 et 492B, qui peuvent être utilisées de façon autonome, pour couvrir la gamme complète de potentiel irritant. La combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux), visant à exploiter ensemble les avantages de chacune des méthodes *in vitro* testant les différents potentiels d'irritation et/ou les différentes classes chimiques, et à les compléter par les connaissances actuelles relatives aux aspects mécaniques de la toxicité oculaire, dans le cadre d'une approche intégrée en matière d'essais et d'évaluation (IATA), pourrait remplacer le test oculaire de Draize (1)(2) pour décider d'une classification dans une catégorie de danger telle que définie dans le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage (SGH) des Nations Unies (ONU) (1). L'approche « top-down » est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant, alors que l'approche « bottom-up » est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante nécessitant une classification (1)(2).

3. La méthode macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation (OI®) est une méthode biochimique acellulaire *in vitro* pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières décrites aux paragraphes 4 à 9 de l'Annexe A, pour classer et étiqueter les produits chimiques en fonction de leur caractère dangereux pour l'œil. Même si elle n'est pas jugée valide pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin, la méthode d'essai OI® est recommandée comme première étape d'une stratégie « top-down » telle que décrite dans le document-guide 263 de l'OCDE (1) pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (3), sans essai supplémentaire. La méthode OI® est aussi recommandée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, ainsi que le définit le SGH de l'ONU (« sans catégorie ») (3), et peut donc être utilisée comme première étape dans le cadre d'une stratégie d'essai « bottom-up » (document-guide 263 de l'OCDE) (1).

4. La méthode d'essai macromoléculaire OptiSafe Eye Irritation Test (OptiSafe EIT) est une méthode biochimique acellulaire *in vitro* pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières décrites aux paragraphes 4 à 8 de l'Annexe B, pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, ainsi que le définit le SGH de l'ONU (« sans catégorie ») (3), et qui peut donc être utilisée comme première étape dans le cadre d'une stratégie d'essai « bottom-up » (document-guide 263 de l'OCDE) (1).

5. Les méthodes OI® et OS diffèrent sur les points suivants : 1) caractérisation du produit chimique d'essai, 2) préparation des réactifs, 3) procédures de manipulation physicochimique, 4) interprétation des résultats.

6. Un produit chimique que la méthode OI® n'a pas identifié comme provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et que ni la méthode OI®, ni la méthode OS™ n'ont identifié comme ne relevant d'aucune classification (« sans catégorie » du SGH de l'ONU) nécessiterait d'être soumis à des essais ou à une recherche d'informations complémentaires visant à établir une classification définitive. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette Ligne directrice doivent être envisagés dans le contexte du Document d'orientation 263 de l'OCDE, dans lequel les approches « top-down » et « bottom-up » constituent une étape d'une IATA (1).

7. L'objectif de la présente Ligne directrice est de décrire les protocoles d'évaluation du potentiel de danger oculaire d'un produit chimique d'essai suivant chacune des méthodes d'essai macromoléculaires *in vitro* OI® (Appendice A) et OS (Appendice B).

## INTRODUCTION – RÉFÉRENCES

1. OCDE (2018). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Series on Testing and Assessment, No. 263. Environment, Health and Safety Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2017\)15&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15&doclanguage=en)
2. Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
3. United nations (UN) (2023). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Tenth revised edition, UN New York and Geneva, 2023. Available at: <https://unece.org/sites/default/files/2023-07/GHS%20Rev10e.pdf>

# Appendice A. Méthode d'essai Ocular Irritation (OI<sup>®</sup>) d'identification (i) de produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, et (ii) de produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves

1. La méthode d'essai OI<sup>®</sup> exploite un mélange réactif macromoléculaire composé de protéines, de glycoprotéines, de glucides, de lipides et d'éléments à faible poids moléculaire qui, une fois réhydraté, forme une matrice macromoléculaire complexe qui reproduit la structure hautement organisée et transparente de la cornée (1, 2). L'opacité cornéenne est considérée comme le principal critère de classification des dangers pour l'œil (3). L'opacité peut être provoquée par les effets perturbateurs des produits chimiques d'essai sur la structure hautement organisée des protéines et glucides de la cornée, notamment par « coagulation », c'est-à-dire précipitation ou dénaturation des macromolécules (notamment les protéines), ou par « saponification », c'est-à-dire décomposition des lipides (4). Les produits chimiques dangereux pour l'œil provoquent une turbidité du réactif macromoléculaire par dénaturation, dépliement et changement de conformation des protéines, mais aussi par perturbation et désagrégation des éléments macromoléculaires de la matrice. La méthode OI<sup>®</sup> a d'abord été mise au point pour tester l'effet perturbateur de produits irritants pour les yeux provoquant une opacification de la cornée, cependant les résultats de l'étude de validation indiquent que la méthode permet également de détecter les produits irritants responsables uniquement des lésions conjonctivales décrites dans la méthode d'essai d'irritation oculaire chez le lapin (LD 405 de l'OCDE). En revanche, cet essai macromoléculaire repose sur un système biochimique acellulaire et ne permet donc pas d'étudier la cytotoxicité ni la réversibilité de la toxicité oculaire. En conséquence, au moment d'établir une classification, il convient de tenir compte de tous les mécanismes de toxicité oculaire possibles et pertinents pour un produit chimique d'essai donné, en fonction des données et connaissances existantes, tel que décrit dans le document-guide 263 (5).

2. L'essai OI® est la première méthode d'essai macromoléculaire validée pour l'identification de produits chimiques d'essai provoquant des lésions oculaires graves (Catégorie 1 du SGH de l'ONU) ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ni lésions oculaires graves (« sans catégorie » selon le SGH de l'ONU). L'essai est désigné Méthode de référence validée (MRV), étant donné qu'il existe des normes de performance (6) permettant de faciliter la validation de méthodes d'essai macromoléculaires *in vitro*, nouvelles ou modifiées, similaires à l'essai Ocular Irritation®, conformément aux principes énoncés dans le document-guide 34, et de modifier rapidement la présente Ligne directrice pour y intégrer lesdites méthodes. L'acceptation mutuelle des données (AMD) ne sera garantie que pour les méthodes d'essai validées selon les normes de performance et si ces méthodes d'essai ont été examinées et ajoutées à la présente Ligne directrice par l'OCDE.

3. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est soumis à l'essai, sans référence à l'applicabilité de la méthode macromoléculaire *in vitro* aux essais de substances et/ou mélanges. Les définitions des termes utilisés sont données à l'annexe 1.

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

4. La méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation® a été soumise à une étude de validation indépendante entre 2009 et 2012 (8), suivie en 2016 d'un examen indépendant par des pairs réalisé par le Comité scientifique consultatif (ESAC) du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour la promotion des méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (9). Suivant les recommandations de l'ESAC, un groupe d'experts de l'OCDE a évalué en détail les données supplémentaires relatives à la caractérisation du matériau de départ utilisé dans l'essai, à savoir la matrice macromoléculaire en poudre, et à sa stabilité dans le temps. Au total, 89 produits chimiques d'essai ont été évalués dans l'étude de validation, dont 13 mélanges et 76 substances. Ces produits chimiques couvraient un large spectre de groupes fonctionnels, 20 d'entre eux étaient classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU, 26 dans la catégorie 2 et 43 étaient non classés selon le SGH de l'ONU. Ils comprenaient 25 solides, 57 liquides et 7 produits visqueux. La Ligne directrice s'applique aux produits chimiques solides et liquides présentant un pH compris dans l'intervalle  $4 \leq \text{pH} \leq 9$  en solution ou dispersion à 10 % (v/v ou p/v, en fonction des cas). Les liquides peuvent être visqueux ou non visqueux. Les solides peuvent être solubles ou non solubles dans l'eau, car ils sont testés tel quel à moins de posséder des propriétés tensioactives. Les gaz et aérosols n'ont pas encore été évalués dans l'étude de validation et sont donc exclus du domaine d'applicabilité de la méthode.

5. Des données tirées d'essais réalisés avec des versions antérieures de la méthode OI® ou de l'étude de validation (10) ont permis d'identifier des limites spécifiques concernant certains produits chimiques qui entrent dans le domaine d'applicabilité défini au paragraphe 6 (c'est-à-dire, les produits chimiques très colorés, causant un relargage des protéines ou hautement volatils, et les concentrations élevées de certains tensioactifs), car ils peuvent interférer avec le système d'essai. L'interférence peut prendre la forme d'une inhibition fonctionnelle de la matrice macromoléculaire, détectée par des mesures spécifiques de DO<sub>405</sub> pour certains témoins et produits chimiques d'essai (paragraphe 19-20), ou d'observations spécifiques au système d'essai qui constituent une partie intégrante du rapport et de l'analyse des résultats (paragraphe 22). Les critères d'acceptabilité de l'essai spécifiés aux paragraphes 19 et 20 et intégrés dans le logiciel fourni, garantissent le suivi et la détection de ces phénomènes limitants.

6. La Ligne directrice s'applique aux substances et aux mélanges. Toutefois, avant d'utiliser

la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques difficiles à tester (parce qu'instables ou polymérisables, tels que ceux contenant des acrylates, par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables ou du moins acceptables pour une utilisation à des fins réglementaires. De plus, il convient de tenir compte des connaissances relatives au mécanisme de la présente méthode *in vitro* et à sa relation avec les mécanismes des produits chimiques soumis à l'essai. Si nécessaire, une méthode *in vitro* complémentaire peut être utilisée, reposant si possible sur des mécanismes d'action différents, tel que décrit dans le document-guide 263 (5) de l'OCDE.

7. La performance de la méthode d'essai OI® a été évaluée au moyen d'un calcul pondéré des prédictions individuelles de chaque résultat qualifiant pour chaque produit chimique utilisé lors de la validation dans chacun des laboratoires participants, tel que le recommande le Comité scientifique consultatif de l'EURL-ECVAM (9)<sup>1</sup>. Utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* présente une précision d'ensemble de 75 % (66.5/89), une spécificité de 81 % (55.8/69) et une sensibilité de 54 % (10.7/20), en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin classées selon le SGH de l'ONU (8) (11), les résultats de cette méthode sur les yeux de lapin présentant leur propre degré d'incertitude. Ces résultats comprennent le produit chimique tétraéthylène glycol diacrylate (CAS. 17831-71-9), classé en catégorie 1 selon le SGH de l'ONU, qui est instable et agit comme un agent polymérisant sensible à la lumière, et est identifié comme générant des résultats négatifs lors d'essais similaires d'irritation de l'œil. Si cette substance difficile n'est pas prise en compte dans l'analyse de la performance, la méthode macromoléculaire *in vitro* montre une précision d'ensemble de 76 % (66.5/88), une spécificité de 81 % (55.8/69), une sensibilité de 56 % (10.7/19), un taux de faux positifs de 19% (13.1/69) et un taux de faux négatifs de 44 % (8.3/19). Avec la présente méthode, les produits chimiques de catégorie 1 selon le SGH de l'ONU évalués sur la seule base d'effets durables mais non graves *in vivo* présentaient un risque accru de sous-estimation (5/7). Toutefois, le taux de faux négatifs (produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU mais non identifiés comme tels) n'est pas préoccupant dans ce contexte, car tous les produits chimiques d'essai qui donnent des résultats négatifs feront ensuite l'objet d'un ou de plusieurs autres essais *in vitro* dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve et conformément au document-guide 263 (5) de l'OCDE.

8. Utilisée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, la méthode d'essai OI® présente une précision d'ensemble de 75 % (67.0/89), une sensibilité de 91 % (41.7/46) et une spécificité de 59 % (25.3/43), sur la base d'une approche pondérée, en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin classées selon le SGH de l'ONU (8) (11), les résultats de cette méthode sur les yeux de lapin présentant leur propre degré d'incertitude. Ces résultats comprennent le produit chimique tétraéthylène glycol diacrylate (CAS. 17831-71-9), classé en catégorie 1 selon le SGH de l'ONU, qui est instable et agit comme un agent polymérisant sensible à la lumière, et est identifié comme générant des résultats négatifs lors d'essais similaires d'irritation de l'œil. Si cette substance difficile n'est pas prise en compte dans l'analyse de la performance, la méthode macromoléculaire *in vitro* montre une exactitude de 76 % (67/88), une spécificité de 59 % (25.3/43), une sensibilité de 93 % (41.7/45), un taux de faux positifs de 41 % (17.7/43) et un taux de faux négatifs de 7 % (3.3/45) en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin classées selon

---

<sup>1</sup> La performance calculée basée sur la majorité des résultats est comparable (8)(9).

le SGH de l'ONU (8) (11). Cependant, le taux de faux positifs dans ce contexte (produits chimiques identifiés comme classables alors qu'en réalité ils ne nécessitent pas de classification) n'est pas critique puisque tous les produits chimiques identifiés ainsi feront ensuite l'objet d'un ou de plusieurs autres essais *in vitro* dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve et conformément au document-guide 263 (5) de l'OCDE. On notera que, conformément à l'approche IATA décrite dans le document-guide 263 (5) de l'OCDE, les produits chimiques comprenant un groupe acrylate ne sont pas des candidats potentiels pour une approche « bottom-up », car ce groupe fonctionnel peut être associé à des alertes pour irritation cutanée et n'est donc pas compatible avec les hypothèses qui amèneraient à lancer une approche « bottom-up » (voir graphique 1, partie 2 du document-guide 263 (5) de l'OCDE).

9. La méthode OI® n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques d'essai devant être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques d'essai devant être classés comme légèrement irritants pour l'œil (catégorie 2B du SGH de l'ONU) en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU sous-classés dans les catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU surclassés dans les catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU. Pour classer ces produits chimiques, des informations et/ou des essais complémentaires suivant d'autres méthodes sont nécessaires, conformément au document-guide sur les IATA (5).

## PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation® comprend deux éléments : une matrice macromoléculaire et une membrane circulaire servant à maîtriser l'application du produit chimique d'essai à la matrice macromoléculaire. Ce système biochimique acellulaire ne permet pas d'étudier le rôle de la cytotoxicité dans la toxicité oculaire. La matrice macromoléculaire est la cible du produit chimique d'essai ; elle est composée d'un mélange de protéines, de glycoprotéines, de glucides, de lipides et d'éléments à faible masse moléculaire qui forment une matrice gélifiée. Les oligomères qui composent la matrice s'auto-assemblent, formant des fibrilles d'ordre supérieur tenues ensemble par des liaisons non covalentes. Lorsqu'elle est réhydratée avec une solution saline tamponnée, la matrice macromoléculaire forme une structure hautement organisée transparente. Il est communément admis que les produits chimiques d'essai provoquant des lésions oculaires dénaturent le collagène et provoquent la saponification des lipides (par exemple, les produits alcalins), la coagulation et la précipitation des protéines (par exemple, les acides) et/ou la dissolution des lipides (par exemple, les solvants) (12). Les produits chimiques d'essai provoquant la dénaturation, le dépliement et des changements de conformation des protéines induisent une désorganisation et une désagrégation de la structure hautement organisée de la matrice macro-moléculaire, ce qui génère une turbidité du réactif macromoléculaire. À l'aide d'un spectromètre, ce phénomène peut être quantifié en mesurant les changements de diffusion de la lumière à une longueur d'onde de 405 nm et en comparant ces valeurs à une courbe d'étalonnage (établie en parallèle en mesurant la hausse de la densité optique (DO) induite par une série de substances étalon). La courbe d'étalonnage permet de calculer un score d'équivalence Irritation/Draize (EID) pour chaque dose ou concentration du produit chimique d'essai (voir les précisions au paragraphe 18). Le score d'EID le plus élevé entre cinq doses ou concentrations d'un produit chimique d'essai est appelé score maximal qualifié (SMQ), et est utilisé pour déterminer la catégorie de danger à laquelle appartient le produit chimique selon SGH de l'ONU, en fonction de valeurs seuil prédéfinies (voir paragraphe 21).

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

11. Pour tout laboratoire mettant en œuvre la méthode d'essai OI® pour la première fois, la liste des produits chimiques d'épreuve de compétence est fournie à l'Annexe 3 de l'Appendice 3. Il convient que le laboratoire utilise ces substances pour démontrer sa compétence technique en matière d'application de la méthode d'essai OI® avant de soumettre ses résultats à des fins de classification réglementaire des dangers.

## MODE OPÉRATOIRE

12. Un protocole est disponible pour la méthode OI® et il convient de l'appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai en laboratoire (10). Les paragraphes qui suivent décrivent les principales composantes et procédures de la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro*, sur la base du protocole d'Ocular Irritection.

### **Caractérisation du produit chimique d'essai**

13. On mesure le pH d'une solution à 10 % du produit chimique d'essai dans l'eau, afin de vérifier qu'il entre dans le domaine d'applicabilité de l'essai. Une procédure détaillée pour la mesure du pH de produits chimiques présentant différents degrés de solubilité est fournie dans le protocole de l'essai (10). En outre, les produits chimiques d'essai dont les propriétés tensioactives ne sont pas clairement identifiées sont soumis au test de saponification décrit dans le protocole (10), l'objectif étant de déterminer la meilleure procédure d'application du produit chimique d'essai parmi celles décrites au paragraphe 15. Le test de saponification permet d'évaluer la proportion et la tenue de la couche de mousse produite quand la solution à 10 % du produit chimique d'essai (10) est mélangée pendant 10 secondes au vortex.

### **Préparation et activation du réactif**

14. La base de la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritection® est la préparation d'une matrice macromoléculaire. Pour ce faire, le réactif en poudre fourni dans le kit est dissout dans une solution de réhydratation, puis le réactif dissout est filtré. Le pH et la température de la solution obtenue doivent être compris dans des plages pré-établies : pour le pH, 7.9-8.2 ; pour la température, 20-25 °C. De plus, la solution de réactif obtenue (ainsi que le témoin tampon de blanc soumis à l'essai en parallèle pour chaque dose ou concentration d'essai) doit être activée à l'aide d'une solution tamponnée d'activateur qui abaisse le pH de la solution de réactif et déclenche la formation de la matrice macromoléculaire ordonnée. Le pH de la solution de réactif activée (solution réactionnelle) doit être compris dans une plage pré-établie (à savoir, 6.4-6.7) à température ambiante (20-25 °C). La solution réactionnelle de la matrice de protéines est transférée par aliquotage dans une plaque 24 puits.

### **Application des produits chimiques d'essai**

15. Les produits chimiques sont soumis à l'essai à température ambiante (20-25 °C) directement sur la matrice macromoléculaire ou sur une membrane de cellulose, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Appendice A, Annexe 2A, graphique 1). Pour les produits chimiques d'essai non tensioactifs connus, ou les produits inconnus identifiés comme ne possédant pas de propriétés tensioactives ou affines d'après le test de saponification décrit au paragraphe 13 et dans le protocole d'essai (10), on applique cinq doses (25, 50, 75, 100 et 125 µl pour les liquides ou mg pour les solides) directement sur la membrane circulaire positionnée sur la solution réactionnelle



(matrice). Les solides peuvent être broyés pour assurer la répartition homogène du produit chimique d'essai sur toute la surface de la membrane. Pour les produits chimiques d'essai tensioactifs connus, et les produits inconnus identifiés comme possédant des propriétés tensioactives ou affines d'après le test de saponification (10), on prépare une solution de travail dans l'eau distillée à 5 %, puis l'on procède à une série de cinq dilutions de facteur 2 (c.-à-d., 0.3125 %, 0.625 %, 1.25 %, 2.5 % et 5 %). On applique 125 µl des cinq dilutions directement sur la solution réactionnelle (solution macromoléculaire activée), puis on recouvre les puits avec la membrane circulaire (Appendice A, Annexe 2A). Les cires solides (morceaux) sont appliquées sans dilution directement sur la solution réactionnelle et recouverts avec la membrane circulaire (Appendice A, Annexe 2A).

16. La matrice macromoléculaire de la méthode Ocular Irritection® est exposée aux produits chimiques d'essai et aux témoins parallèles pendant  $24.0 \pm 0.5$  h, dans un incubateur à  $25 \pm 1$  °C. Après l'exposition, le système est contrôlé visuellement. Pour les produits chimiques non tensioactifs (ou les produits inconnus identifiés comme ne possédant pas de propriétés tensioactives ou affines d'après le test de saponification (10)), les membranes sur disque doivent être intactes. De plus, une baisse de volume dans les puits peut être révélatrice d'effets hygroscopiques ou de problèmes techniques. Dans ce cas, l'essai est répété une fois. Si l'on observe les mêmes effets, le produit chimique d'essai est considéré comme exclu du champ d'applicabilité ou incompatible avec la méthode.

### **Produits chimiques témoins**

17. Les témoins sont soumis à l'essai en parallèle du produit chimique. Dans le cas de l'essai Ocular Irritection®, il s'agit de quatre substances étalon et de deux substances de contrôle qualité (substances QC) fournis dans le kit commercialisé (voir les définitions, Appendice A, Annexe 1). Les substances étalon comprennent quatre produits chimiques classés de « sans catégorie » à « catégorie 1 » selon le SGH de l'ONU et couvrent une plage déterminée de niveaux de DO (tableau 1) qui permettent d'extraire la courbe d'étalonnage, elle-même servant à déterminer le score d'équivalence Irritection/Draize (EID) (voir paragraphe 18 et Appendice A, Annexe 2B). Les deux substances QC ont des plages de scores d'EID déterminées, associées à leur potentiel d'irritation et proches des seuils du modèle de prédiction.

### **Détermination du score d'EID et du SMQ**

18. Après l'incubation, les solutions réactionnelles activées (protéines) des produits chimiques d'essai et des témoins (voir paragraphe 17) sont transférées dans une plaque 96 puits pour lecture de la DO à 405 nm. Le processus de transfert est décrit en détail et illustré dans le protocole fourni dans le kit (10). On mesure la DO brute de chaque puit et on calcule les scores d'EID pour les substances QC et produits chimiques d'essai à l'aide du logiciel et des formules présentés à l'Appendice A, Annexe 2B. Le SMQ d'un produit chimique est déterminé par un réplicat qualifiant unique, sur la base de l'analyse du score de densité optique (DO) des calibrateurs et des substances QC (paragraphe 18), ainsi que les aspects dose-réponse générés avec les cinq doses/concentrations de produit chimique d'essai (paragraphe 15).

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Critères d'acceptation de l'étude**

19. Les résultats qualifiés de la MRV OI® sont déterminés par le logiciel, lequel effectue automatiquement les vérifications de qualification suivantes :

- Vérification de la qualification du réplicat : un des deux critères ci-dessous, applicables aux quatre étalons et aux deux substances QC, doit être rempli pour qu'un réplicat soit considéré comme qualifié et fasse l'objet d'une analyse des données :
  - les valeurs obtenues pour tous les étalons et pour au moins une des deux substances QC sont comprises dans les plages d'acceptabilité pré-établies (tableau 1) ; ou
  - les valeurs obtenues pour trois des quatre étalons et pour les deux substances QC sont comprises dans les plages d'acceptabilité pré-établies (tableau 1). Si la valeur d'une seule substance étalon est située en dehors de la plage d'acceptabilité, le logiciel OI® la remplace par une valeur prédéfinie afin de générer la courbe d'étalonnage.

Un réplicat de la méthode OI® est considéré comme non qualifié lorsque, au choix, les valeurs d'au moins deux étalons, ou les valeurs d'un étalon et d'une substance QC, sont situées en dehors des plages pré-établies.

**Tableau 1. Critères d'acceptation des substances d'étalonnage et de contrôle qualité dans la méthode d'essai Ocular Irritection®**

| <b>Plage d'acceptabilité de la DO<sub>405</sub></b> |               |
|---|---------------|
| Étalon 0  | 0.062 - 0.262 |
| Étalon 1  | 0.089 – 0.315 |
| Étalon 2  | 0.351 - 0.945 |
| Étalon 3  | 1.277 – 2.127 |
| <b>Plage d'acceptabilité de l'EID</b>               |               |
| QC 1  | 7.2-20.8      |
| QC 2  | 23.6-35.6     |

20. Les vérifications supplémentaires suivantes sont réalisées par le logiciel et déclenchent l'interprétation des cinq points de la courbe dose-réponse de l'essai avant que ces dernières ne soient acceptées et utilisées pour déterminer le SMQ du produit chimique d'essai (voir paragraphe 17). Les résultats d'un réplicat qualifié peuvent être exclus après les vérifications suivantes :

- Vérification de la densité optique nette : la DO<sub>λ</sub> nette d'un produit chimique d'essai doit être supérieure à la valeur pré-établie (soit > -0,015). Si la DO<sub>λ</sub> nette d'un produit chimique d'essai est ≤ -0.015, aucun score d'EID significatif ne peut être calculé par extrapolation linéaire, le résultat est donc exclu de toute détermination du SMQ.
- Si la DO<sub>λ</sub> nette d'un produit chimique d'essai dans un réplicat qualifié est inférieure à la DO de l'étalon 2 (DO<sub>étalon2</sub>), une vérification supplémentaire est nécessaire pour vérifier que la matrice macromoléculaire réagit correctement. Pour cela, on ajoute une solution-test d'inhibition, fournie dans le kit de l'essai, puis on mesure à nouveau la DO<sub>λ</sub>, laquelle doit alors être supérieure à la DO<sub>étalon2</sub> pour que les données soient qualifiées et acceptées dans l'interprétation.

- Vérification de la valeur de DO du blanc : une DO<sub>blanc</sub> supérieure à 1.2 pour une dose ou concentration de produit chimique d'essai (quelle qu'elle soit) indique une interférence du produit chimique d'essai (c.-à-d., une coloration intense). Le produit chimique concerné peut être soumis à l'essai à nouveau au moins une fois, pour confirmer l'interférence colorimétrique et exclure ce résultat.
- Pour finir, on vérifie que la réponse en fonction de la dose de produit chimique d'essai est compatible avec un schéma classique, caractéristique de types de produits chimiques connus et correctement classés. Si la réponse en fonction de la dose présente un schéma atypique ou irrégulier pour un produit chimique d'essai, les scores d'EID sont exclus de la détermination du SMQ. On trouvera des exemples de courbes de réponse en fonction de la dose appropriées et qualifiées dans le protocole fourni dans le kit (10).

### Interprétation des résultats et modèle de prédiction

21. En comparant la densité optique (DO<sub>405</sub>) qualifiée d'un produit chimique d'essai à la courbe d'étalonnage (obtenue avec les étalons), on déduit le score d'équivalence Irritation/Draize (EID) pour chaque dose ou concentration d'essai. Le score d'EID le plus élevé est appelé score maximal qualifié (SMQ) et est utilisé pour prédire le potentiel de danger que le produit chimique d'essai représente pour les yeux d'après le SGH de l'ONU (11). Dans le cas de la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation®, le modèle de prédiction est fourni au tableau 2.

**Tableau 2. Modèle de prédiction Ocular Irritation®**

| Score maximal qualifié (SMQ) | Prédiction de classification selon le SGH de l'ONU** |
|------------------------------|--|
| 0 – 12.5                     | Sans catégorie                                       |
| > 12.5 – 30.0                | Aucune prédiction ne peut être faite*                |
| > 30.0                       | Catégorie 1  |

\* Si le SMQ est compris entre 12.5 et 30.0, aucune prédiction ne peut être faite à partir de ce seul résultat. En effet, beaucoup de produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU *in vivo* présentaient un SMQ dans cet intervalle (paragraphe 7) et leur potentiel de danger a donc été sous-estimé avec l'essai macromoléculaire. De plus, beaucoup de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie *in vivo* selon le SGH de l'ONU présentaient un SMQ dans cet intervalle, c'est-à-dire que leur potentiel de danger a été surestimé (paragraphe 8). Pour décider d'une classification définitive d'un produit chimique présentant un SMQ entre 12.5 et 30.0, des informations complémentaires et/ou essais suivant d'autres méthodes sont nécessaires, conformément au document-guide relatif aux IATA (5).

\*\*Au moment d'établir une classification, il convient de tenir compte de tous les mécanismes de toxicité oculaire possibles et pertinents pour un produit chimique d'essai donné, en fonction des données et connaissances existantes, tel que décrit dans le document-guide 263 (5).

## RAPPORT D'ESSAI

22. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants, dès lors qu'ils s'appliquent à l'étude :

### *Produits chimiques d'essai et témoin*

- identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
  - pureté et composition du produit (substance ou mélange) d'essai ou témoin [en pourcentage(s) par unité de poids], dans la mesure où cette information est disponible ;
  - pour les substances multiconstituants et les UVCB : caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;
  - propriétés physicochimiques (telles que l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude, couleur, densité optique ou absorbance ;
  - pH de la solution à 10 % du produit chimique d'essai, déterminé conformément au protocole ;
  - résultat du test de saponification si les propriétés tensioactives ne sont pas précisées par le fournisseur du produit chimique d'essai ;
  - traitement du produit chimique d'essai ou témoin avant l'essai (par exemple, chauffage, broyage), le cas échéant ;
  - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Solvant ou véhicule, le cas échéant.

### *Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai*

- nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.

### *Conditions de la méthode d'essai*

- description du système d'essai utilisé ;
- procédure utilisée pour garantir la performance (c'est-à-dire, la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (par ex., essais périodiques de substances d'épreuve des compétences).

### *Mode opératoire*

- nombre de doses ou concentrations testées ;
- identité du solvant et des témoins étalons, le cas échéant ;
- dose, application et temps d'exposition du produit chimique testé utilisé ;
- description de toute modification éventuelle du protocole.

### *Résultats*

- tableau des DO<sub>405</sub> pour les substances d'étalonnage et QC comprenant les résultats des critères d'acceptabilité appliqués au réplicat : essai qualifié ou non qualifié ;
- tableau des DO<sub>405</sub>, DO<sub>405</sub> nettes et scores d'EID obtenus pour chaque dose de produit

chimique d'essai ;

- résultats des vérifications des critères d'acceptabilité pour les produits chimiques : c.-à-d. résultats exclus et signalement de nouveau test ;
- résultats des nouveaux tests, le cas échéant ;
- description de tout autre effet observé à la fin de la procédure, p. ex. intégrité de la membrane, condensation sur le couvercle de la plaque signalant une évaporation, baisse de volume, coloration ;
- score maximal qualifié et classification *in vitro* dans une catégorie du SGH de l'ONU.

Discussion des résultats

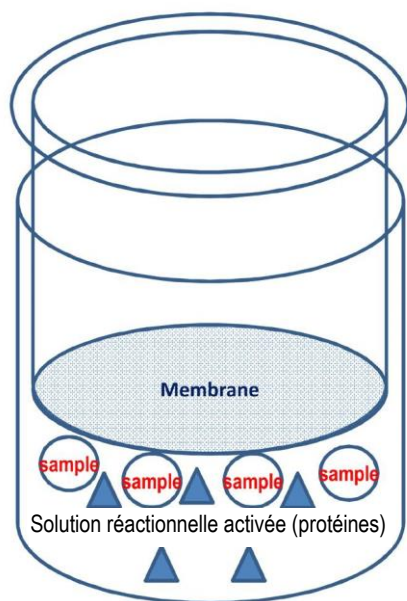
Conclusion

## Appendice A - Références

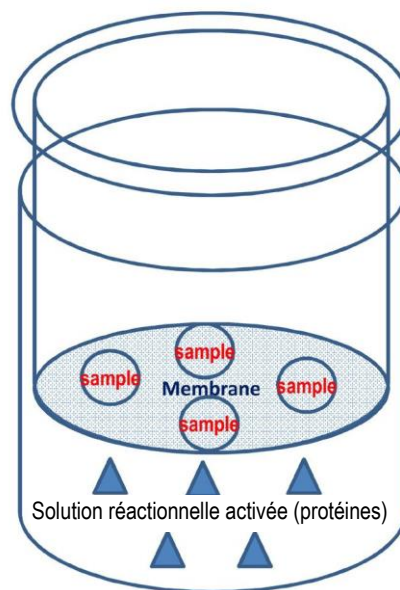
## Appendice A – Annexe 1a

### Illustration du paragraphe 15

Application des substances soumises à l'essai



Tensioactifs et cires non tensioactives



Produits non tensioactifs (excepté cires)

Légende : *sample* = échantillon

## Appendice A – Annexe 1b

### Détails concernant la détermination du score d'EID par le logiciel (voir paragraphe 18).

Après l'incubation, la DO<sub>405</sub> brute des produits chimiques d'essai et des témoins est mesurée à l'aide du spectrophotomètre (comme décrit au paragraphe 18) et les scores d'EID sont calculés par le logiciel intégré, suivant les formules ci-après :

**Équation 1 : Si DO<sub>QC1,2</sub> ou DO<sub>χ</sub> nette < DO<sub>étalon1</sub>, alors :**

$$\text{EID} = (\text{DO}_{\text{QC1,2}} \text{ ou } \text{DO}_{\chi} \text{ nette} / \text{DO}_{\text{étalon1}}) \times 12.5$$

**Équation 2 : Si DO<sub>étalon1</sub> < DO<sub>QC1,2</sub> ou DO<sub>χ</sub> nette < DO<sub>étalon2</sub>, alors :**

$$\text{EID} = [(\text{DO}_{\text{QC1,2}} \text{ ou } \text{DO}_{\chi} \text{ nette} - \text{DO}_{\text{étalon1}}) / (\text{DO}_{\text{étalon2}} - \text{DO}_{\text{étalon1}})] \times 17.5 + 12.5$$

**Équation 3 : Si DO<sub>étalon2</sub> < DO<sub>QC1,2</sub> ou DO<sub>χ</sub> nette < DO<sub>étalon3</sub>, alors :**

$$\text{EID} = [(\text{DO}_{\text{QC1,2}} \text{ ou } \text{DO}_{\chi} \text{ nette} - \text{DO}_{\text{étalon2}}) / (\text{DO}_{\text{étalon3}} - \text{DO}_{\text{étalon2}})] \times 21.0 + 30$$

Si DO<sub>χ</sub> nette > DO<sub>étalon3</sub>, le score d'EID ne peut pas être calculé par extrapolation linéaire, car il n'y a pas de valeur supérieure de DO d'étalonnage.

La **DO<sub>χ</sub> nette pour un produit chimique d'essai** est égale à DO<sub>χ</sub>réactif - DO<sub>χ</sub>blanc, et sert à éliminer le signal dû au tampon seul dans la mesure de DO du produit chimique.

Où :

χ est la dose ou la concentration du produit chimique d'essai

DO<sub>réactif</sub> est la DO mesurée dans le puits contenant le produit chimique d'essai et la solution réactionnelle

DO<sub>blanc</sub> est la DO mesurée dans le puits contenant le produit chimique d'essai dans le témoin tampon de blanc

DO<sub>QC1,2</sub> et DO<sub>étalon0,1,2,3</sub> sont les DO mesurées dans les puits contenant la solution réactionnelle et les substances de contrôle qualité (QC) ou les substances étalons. Il est admis que ces produits chimiques témoins contribuent au signal à 405 nm.



## Appendice A – Annexe 2

### Substances d'épreuve de compétence pour la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* OI®

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en identifiant correctement la classification des dangers pour l'œil des 12 substances recommandées dans le tableau 3. Les résultats de l'application de l'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation® fournis constituent des exemples tirés des résultats obtenus pendant l'étude de validation (8). Comme recommandé dans le document-guide 34<sup>2</sup> de l'OCDE, la sélection comprend, autant que possible, des produits chimiques qui : (i) couvrent la gamme complète des effets *in vivo* de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire selon le SGH de l'ONU (catégories 1, 2A, 2B ou « sans catégorie ») ; (ii) ont été choisis sur la base des données de haute qualité obtenues dans l'essai de référence *in vivo* sur œil de lapin (LD 405 de l'OCDE) (3) (10) ; (iii) couvrent plusieurs états physiques ; (iv) couvrent un large spectre de classes chimiques et de groupes fonctionnels organiques, représentatifs des classes et groupes utilisés dans l'étude de validation (8) ; (v) couvrent la gamme des réponses *in vitro* d'après des données de haute qualité issues de la méthode Ocular Irritation® (SMQ entre 0 et 51) ; (vi) ont conduit à des prévisions correctes et reproductibles avec la MRV ; (vii) sont disponibles dans le commerce ; (viii) ne sont pas excessivement coûteux à acquérir et/ou éliminer. Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou lorsque sa non-utilisation est justifiée, un autre produit chimique remplissant les conditions énoncées ci-avant peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés pour la validation de la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation®, ou un produit chimique de référence figurant dans les normes de performances (OECD, 2019) (6)(8). Ces changements doivent cependant être justifiés.

---

<sup>2</sup> Document-guide de l'OCDE 34 - *Guidance Document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment* (OECD GD 34).

**Tableau 1.** Produits chimiques recommandés pour faire la preuve de la compétence technique relative à l'application de la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro* Ocular Irritation®.

| Nom chimique                   | N° CAS     | SGH de l'ONU <i>in vivo</i> | État physique | pH <sup>A</sup> | Plage SMQ / n = réplicats<br>Moyenne (ET) | Prédiction avec la MRV (7)                        |
|--------------------------------|------------|-----------------------------|---------------|-----------------|---|---|
| 2-Méthylrésorcinol             | 608-25-3   | Catégorie 1                 | Solide        | 5.8             | >51/ n=9<br>n.d. (n.d.)                   | Catégorie 1                                       |
| 4-tert-Butylpyrocatechol       | 98-29-3    | Catégorie 1                 | Solide        | 5.5             | >51/ n=9<br>n.d. (n.d.)                   | Catégorie 1                                       |
| Chlorure de benzalkonium (5 %) | 63449-41-2 | Catégorie 1                 | Liquide       | 6.5             | 49.5/ n=1<br>n.d. (n.d.)                  | Catégorie 1 <sup>B</sup>                          |
| Hydrochlorure de prométhazine  | 58-33-3    | Catégorie 1                 | Solide        | 4.5             | >51/ n=9<br>n.d. (n.d.)                   | Catégorie 1                                       |
| Nitrate d'ammonium             | 6484-52-2  | Catégorie 2A                | Solide        | 4.8             | 14.1-27.3/ n=12<br>20.2 (3.0)             | Aucune prédiction ne peut être faite              |
| Bromure d'hexadécylpyridinium  | 140-72-7   | Catégorie 2A                | Liquide       | 4.7             | 15/ n=1<br>n.d. (n.d.)                    | Aucune prédiction ne peut être faite <sup>B</sup> |
| Acétate de méthyle             | 79-20-9    | Catégorie 2A                | Liquide       | 6.8             | 15.0-21.1/ n=12<br>18.6 (1.5)             | Aucune prédiction ne peut être faite              |
| Benzoate de sodium             | 532-32-1   | Catégorie 2A                | Solide        | 8.2             | 7.4-20/ n=9<br>15.4 (2.5)                 | Aucune prédiction ne peut être faite              |
| 1,5-dibromopentane             | 111-24-0   | Sans catégorie              | Liquide       | 5.7             | 6.7-10.3/ n=9<br>8.6-1.0                  | Sans catégorie                                    |
| Bromure d'hexadécylpyridinium  | 140-72-7   | Sans catégorie              | Liquide       | 7.1             | 4-12.5/ n=10<br>6.8 (1.5)                 | Sans catégorie                                    |
| Myristate de myristyle         | 3234-85-3  | Sans catégorie              | Solide        | 6.3             | 2.7-6.5/ n=9<br>4.6 (1.3)                 | Sans catégorie                                    |
| Tétrafluoroborate de potassium | 14075-53-7 | Sans catégorie              | Solide        | 4.5             | 6.8-19.2/ n=11<br>9.9 (2.1)               | Sans catégorie                                    |

Abréviations : n° CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service ; n.d. : non disponible ; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (11).

<sup>A</sup> Les valeurs de pH sont arrondies à une décimale près et ces valeurs ont été obtenues auprès des sources d'origine, comme précisé dans le document (10).

<sup>B</sup> Produits chimiques d'essai pour lesquels les données de reproductibilité intra- et interlaboratoire sont limitées, mais ayant été inclus car ils présentent des propriétés chimiques et/ou des résultats pertinents.

## Appendice B : Méthode OptiSafe Eye Irritation Test™ pour l'identification des produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

1. La méthode OptiSafe Eye Irritation Test™ (OS) utilise une matrice d'essai macromoléculaire composée de protéines, lipides et nucléotides dérivés de plantes, et n'inclut pas d'ingrédient ou de composés d'origine animale. Elle sert à mesurer l'étendue des lésions affectant la matrice macromoléculaire lorsque celle-ci est exposée à un produit chimique d'essai. Elle permet ainsi de prédire la toxicité pour l'œil du produit chimique soumis à l'essai. La méthode d'essai OS comprend des procédures qui augmentent la sensibilité, la spécificité et la précision, et qui étendent le domaine d'applicabilité (1 – 10), notamment des niveaux d'acide ascorbique dans les larmes qui réduisent le taux de faux positifs (3, 4, 16 – 10), un essai préliminaire de solubilité et des procédures de manipulation physicochimique (PMPC) pour les substances présentant différentes solubilités afin de réduire les taux de faux négatifs (1), un essai préliminaire de tamponnage et des PMPC spécifiques pour les substances présentant différentes capacités tampon afin de réduire le taux de faux négatifs et d'étendre le domaine d'applicabilité (1), ainsi qu'une PMPC pour les tensioactifs qui réduit le taux de faux négatifs pour les tensioactifs non ioniques (9, 10). À ce jour, le domaine d'applicabilité de la présente Ligne directrice pour la méthode d'essai OS inclut uniquement des produits chimiques d'essai solubles qui ne moussent pas et ont peu ou pas de capacité tampon, et entrent ainsi dans le domaine d'applicabilité de la PMPC de l'Essai OS sur membrane (MA, *Membrane Assay*) (comme déterminé à partir de l'essai préliminaire).

2. L'essai OS est une méthode d'essai macromoléculaire pour l'identification de produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« sans catégorie » dans le SGH de l'ONU), qui a fait l'objet d'une validation indépendante.

3. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est mis à l'essai et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode macromoléculaire *in vitro* pour les essais sur des substances et/ou mélanges. Les définitions des termes utilisés sont données à l'Annexe 1.

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

4. La méthode d'essai macromoléculaire acellulaire OS a fait l'objet d'une étude de validation indépendante en 2018, ainsi que d'études complémentaires et d'une mise à jour de 2019 à 2022 (1 – 10). Dans le cadre de l'étude de validation indépendante de 2018, trois laboratoires (le laboratoire principal et deux autres laboratoires) ont évalué la performance de la méthode d'essai OS dans deux phases codées différentes : transférabilité et domaine d'applicabilité. Pour la phase de transférabilité, les trois laboratoires ont mis à l'essai 27 substances. La transférabilité interlaboratoire était de 91.3 %. Pour la phase de domaine d'applicabilité, 51 substances supplémentaires ont été mises à l'essai par le laboratoire principal. Au total, ce sont donc 78 substances qui ont été mises à l'essai (8). Suite à l'étude de validation, la méthode d'essai OS a fait l'objet d'études complémentaires qui ont conduit à une mise à jour de la formulation de la matrice, à laquelle on a ajouté l'acide ascorbique. La présente Ligne directrice couvre cette version actualisée de la méthode d'essai OS qui inclut l'acide ascorbique, les mises à jour de l'essai préliminaire et un modèle de prédiction unifié (8, 9). Lors des études de validation de cette méthode actualisée, 147 produits chimiques ont été mis à l'essai en triplicat. Sur ces 147 produits chimiques, 78 ont été mis à l'essai dans le cadre de l'étude de validation indépendante. Les essais préliminaires ont indiqué que sur ces 147 produits chimiques, 71 (dont 59 liquides et 12 solides) entrent dans le domaine d'applicabilité de la PMPC de l'Essai OS MA couverte par la présente Ligne directrice (9). S'agissant du mercaptoacétate d'isooctyle (n° CAS 25103–09-7), il a été exclu de l'analyse car on a constaté que l'étude *in vivo* de référence utilisait ce produit chimique à une pureté de 99 %. Or le flacon codé utilisé dans le cadre de l'étude, qui a donné un faux positif, avait une pureté de seulement 94.9 %. Le second essai avec un nouveau flacon à au moins 98 % de pureté a donné un vrai négatif. Ainsi, sur la base du résultat du second essai, le mercaptoacétate d'isooctyle est un vrai négatif (VN) OptiSafe, et le résultat initial est rejeté pour des raisons de pureté (8). Pour ce qui est des produits chimiques relevant du domaine d'applicabilité des PHCP MA, seules des substances chimiques ont été mises à l'essai ; aucun mélange n'a été inclus. Parmi ces produits chimiques, qui couvrent un large spectre de groupes fonctionnels, 12 ont été classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU, 20 dans la catégorie 2 du SGH de l'ONU et 39 sont « non classés » dans le SGH de l'ONU.

5. Des limites spécifiques ont été identifiées pour les produits chimiques d'essai considérés comme ne répondant pas aux critères (CNR, « critères non remplis »). La méthode d'essai OS ne peut pas fournir de résultats pour des produits chimiques CNR. On constate des CNR lorsque la plage photométrique du spectrophotomètre est dépassée et qu'on observe une courbe dose-réponse inverse en dessous de la valeur seuil d'irritation (8, 9). Cela peut être la conséquence de résultats positifs extrêmement élevés, ou bien d'une interférence dans l'essai due à de fortes concentrations d'oxydes métalliques ou à des substances très fortement colorées. L'oxyde de zinc et les hautes concentrations d'oxydes métalliques présents dans les fards à paupières peuvent donner lieu à des CNR ou à des résultats positifs élevés ; les crèmes solaires et les fards à paupières contenant de l'oxyde de zinc sont généralement en dehors du domaine d'applicabilité. En cas de CNR, il convient de soumettre le produit chimique à autre type d'essai d'irritation oculaire sans recours à l'expérimentation animale. Les gaz et aérosols n'ont pas encore été évalués dans le cadre d'une étude de validation et sont par conséquent exclus du domaine d'applicabilité.

6. La méthode d'essai OS est applicable aux produits chimiques (substances et mélanges) solides et liquides non moussants, qui ont peu ou pas de capacité tampon, et qui entrent dans le

domaine d'applicabilité de la PMPC MA. Les liquides peuvent être visqueux ou non visqueux. Les scores OS permettant d'identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« sans catégorie » dans le SGH de l'ONU) sont indiqués dans le Tableau 4.

7. Toutefois, avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables ou du moins acceptables pour une utilisation à des fins réglementaires. De plus, il convient de tenir compte des connaissances relatives au mécanisme de la méthode *in vitro* sélectionnée et à sa relation avec les mécanismes des produits chimiques soumis à l'essai. Si nécessaire, une méthode *in vitro* complémentaire peut être utilisée, reposant si possible sur des mécanismes d'action différents, comme indiqué dans le document-guide 263 (GD 263) de l'OCDE (5).

8. Pour évaluer la performance de la méthode d'essai OS, on a effectué une prédiction globale en appliquant la règle majoritaire à l'ensemble de toutes les prédictions tirées de chaque résultat relatif à chaque produit chimique d'essai qui avait servi pour valider et étendre l'application de la version originale. Utilisée pour identifier les produits chimiques entrant dans le domaine d'applicabilité de la PMPC MA qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, la méthode d'essai OS s'est avérée avoir une précision d'ensemble de 90 % (63/70), une sensibilité de 100 % (31/31) et une spécificité de 82.1 % (32/39), sur la base d'une approche de prédiction majoritaire, en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin classées selon le SGH de l'ONU (12), les résultats de cette méthode sur les yeux de lapin présentant leur propre degré d'incertitude (12).

9. La méthode d'essai OS n'est actuellement pas recommandée pour identifier les produits chimiques d'essai qui provoquent de graves lésions des yeux, c'est-à-dire les produits chimiques à classer dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU, en raison du nombre considérable de produits chimiques relevant de la catégorie 2 du SGH de l'ONU surclassés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU. En outre, la méthode d'essai OS n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques d'essai qui provoquent une irritation des yeux, que cette irritation soit sévère (catégorie 2 ou 2A du SGH de l'ONU) ou non (catégorie 2B du SGH de l'ONU). Pour classer ces produits chimiques, des informations et/ou des essais complémentaires suivant d'autres méthodes sans recours à l'expérimentation animale sont nécessaires, conformément au document-guide sur les IATA (13).

### PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La méthode d'essai OS repose sur une matrice d'essai macromoléculaire exclusive, utilisée pour quantifier le potentiel des produits chimiques d'essai à provoquer une irritation ou une lésion oculaire (1, 4). Dans le cadre de cette méthode d'essai acellulaire, on prédit la toxicité du produit chimique d'essai sur la base de la mesure de l'étendue des lésions macromoléculaires. Plus précisément, on mesure l'étendue des lésions ou de la fixation des macromolécules (1–10). Pour réaliser l'essai, on commence par déterminer la solubilité, le pH et le moussage du produit chimique d'essai selon un protocole normalisé qui définit le « domaine d'applicabilité MA ». Le domaine d'applicabilité MA inclut des produits chimiques qui ne moussent pas et ont peu ou pas de capacité tampon. On ajoute les produits chimiques d'essai à des « disques oculaires » pour contrôler leur écoulement lorsqu'ils pénètrent dans le mélange réactif (1, 4). On lit les résultats à l'aide d'un spectrophotomètre, et on compare les valeurs d'absorbance (DO, densité optique) (à 400 nm) et de pH aux valeurs obtenues avec des substances de contrôle qualité (QC, *quality*

*control*) et à celles d'une courbe d'étalonnage pour calculer le score OS. On applique ensuite le score OS à un modèle de prédiction pour classer le produit mis à l'essai.

### DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

11. Pour tout laboratoire mettant en œuvre la méthode d'essai OS pour la première fois, la liste des produits chimiques d'épreuve de compétence est fournie à l'Annexe 2 de l'Appendice B. Le laboratoire doit utiliser ces produits chimiques d'épreuve de compétence pour apporter la preuve de sa compétence technique à exécuter la méthode d'essai macromoléculaire avant de réaliser des essais pour identifier le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques d'essai.

### MODE OPÉRATOIRE

12. Un protocole est disponible pour la méthode OS et il convient de l'appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai en laboratoire (8, 9, 14). À ce jour, seule la procédure de manipulation physicochimique de l'essai sur membrane OptiSafe Eye Irritation Test™ (PMPC OS MA) est couverte par la présente Ligne directrice. Les paragraphes qui suivent décrivent les principales composantes et procédures de la méthode d'essai macromoléculaire *in vitro*, sur la base du protocole OS.

#### **Caractérisation du produit chimique d'essai**

13. Pour la méthode d'essai OS, les propriétés physicochimiques (solubilité, capacité tampon et moussage) spécifiques du produit chimique d'essai sont mesurées lors de l'essai préliminaire. En fonction de celles-ci, le protocole subit des modifications mineures qui améliorent la sensibilité et la précision (6 – 9). On détermine la solubilité d'un produit chimique d'essai en mesurant la DO d'une solution à 10 % du produit chimique d'essai dans un tampon de blanc (TB), fourni dans le kit, et en observant si le produit chimique d'essai flotte à la surface (F), s'agrège au milieu (A) ou coule au fond du tube (C). On détermine la capacité tampon d'un produit chimique d'essai en mesurant le pH d'une solution à 10 % du produit chimique d'essai dans un agent actif et en calculant le score tampon. Enfin, on détermine le moussage du produit chimique d'essai en agitant au vortex une solution à 10 % de produit chimique d'essai dans un TB et en mesurant la colonne de mousse. Les propriétés physicochimiques ainsi objectivement mesurées sont ensuite utilisées pour définir les étapes de manipulation physicochimique avec les modifications mineures requises le cas échéant. Le Tableau 1 recense tous les résultats possibles de l'essai préliminaire et les PMPC spécifiques associées à chacun. Comme indiqué dans ce tableau, seule la PMPC MA est incluse dans la présente Ligne directrice.

Tableau 1. Résultats de l'essai préliminaire OptiSafe Eye Irritation Test™

| PMPC | Résultat de l'essai préliminaire |          |            |                 | Modification de la procédure | Statut réglementaire                      |
|------|----------------------------------|----------|------------|-----------------|------------------------------|---|
|      | État physique                    | Moussage | Solubilité | Capacité tampon |                              |   |
| *MA  | L, S                             | N        | O          | Faible          | Aucune modification          | Incluse dans la présente Ligne directrice |

\*À ce jour, la PMPC MA est la seule couverte par la présente Ligne directrice. PMPC = procédure de manipulation physicochimique ; la procédure d'essai préliminaire de la méthode d'essai OptiSafe Eye Irritation Test comprend : essai de moussage, essai de solubilité et essai de capacité tampon ; L = liquide, S = solide, N = non, O = oui ; En attente = en attente d'études complémentaires et d'acceptation réglementaire.

### Préparation et activation du réactif

14. La matrice macromoléculaire qui sert de base à la méthode d'essai OS est préparée en décongelant les tubes d'agent actif (fournis dans le kit). Pour ce faire, on les plonge dans un bain d'eau à 26–28 °C pendant 40 min (50 min maximum). Pendant que le réactif décongèle, on reconstitue la solution d'ajustement du pH (fournie dans le kit) avec 10 mL d'eau déminéralisée. Après la décongélation, le pH doit se situer dans la plage prédéfinie (7.8–8.1). Le pH de la solution d'agent actif (solution réactionnelle de la matrice d'essai) doit être ajusté à exactement 6.36 à l'aide de la solution d'ajustement du pH. La solution d'agent actif est transférée par aliquotage dans une plaque 24 puits.

### Application des produits chimiques d'essai

15. La méthode d'essai OS prévoit l'application de cinq doses sur la matrice d'essai macromoléculaire. Pour les produits chimiques d'essai liquides, ces doses sont de 25 µL, 50 µL, 75 µL, 100 µL et 125 µL, et pour les produits chimiques d'essai solides, elles sont de 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg et 250 mg. Les produits chimiques d'essai solides doivent être appliqués sur le disque oculaire avant le début de l'essai, et les produits chimiques d'essai liquides lorsque le disque est sur l'agent actif. Une fois le tout réparti dans la plaque 24 puits avec l'agent actif, incubé la plaque pendant 18–19 h à 30.6 °C–31.3 °C. Après incubation, retirer les disques et lire la DO du réactif d'essai à 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Utiliser ces valeurs de DO pour calculer les scores OS, et appliquer chaque score OS au modèle de prédiction pour classer le produit chimique d'essai (voir plus bas).

### Produits chimiques témoins

16. Le kit d'essai OS comprend trois produits chimiques étalons et deux substances QC (QC1 = 20 % glycérol, n° CAS 56-81-5 ; QC2 = éthanol, n° CAS 64-17-5). Les produits chimiques étalons couvrent une plage définie de réponses DO, lesquelles sont utilisées pour calculer les scores OS. Les deux substances QC ont des plages définies de scores d'OS, associées à leur potentiel d'irritation et proches des valeurs seuils du modèle de prédiction. Pour QC1, le score OS doit être inférieur à 4 et la plage DO<sub>400</sub> acceptable est comprise entre 0.175 et 0.275. Pour QC2, le score OS doit être supérieur à 15 et la plage DO<sub>400</sub> acceptable est comprise entre 0.300 et 0.875.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

**Détermination du score OS**

17. Le Tableau 2 indique comment calculer le score OS. Les valeurs mesurées (VM) correspondent aux DO de l'échantillon (à chaque dose), moins le blanc et moins la DO de l'étalon 0. La valeur étalon la plus proche (VEPP) est basée sur la valeur étalon III ou IV, selon celle qui est la plus proche de celle de la DO de l'échantillon. La valeur désignée (VD) est un multiplicateur attribué à la valeur étalon III (VD = 12.5) ou IV (VD = 8). On utilise la VD de la valeur étalon présentant la DO la plus proche de celle de la DO étalon. Les valeurs I et II, incluses antérieurement, ne sont plus utilisées. Pour calculer le score, on utilise la formule suivante avec la VM, la VEPP et la VD :

**Tableau 2. Calcul du score OptiSafe Eye Irritation Test™**

|   |
|---|
| <p><b>Score OptiSafe Eye Irritation Test = (VM / VEPP) × VD</b></p> <p><b>VM</b> (valeur mesurée) = DO échantillon – DO du blanc – DO moyenne de l'étalon 0</p> <p><b>VEPP</b> (valeur étalon la plus proche) = DO moyenne de l'étalon – DO moyenne de l'étalon 0</p> <p><b>VD</b> (valeur désignée) = multiplicateur attribué à l'étalon</p> |
|---|

**Critères d'acceptabilité**

18. L'échantillon d'essai est considéré comme positif si l'un des scores OS dépasse la valeur seuil du modèle de prédiction. Les échantillons négatifs doivent présenter une courbe dose-réponse plane [l'écart observé entre la dose la plus élevée et la dose la plus basse (valeurs de DO brutes) ne doit pas dépasser 35 %]. Les échantillons d'essai dont le score OS le plus haut est inférieur ou égal à 15 et qui donnent lieu à une diminution de 35 % ou plus de la dose la plus élevée à la dose la plus basse sont considérés comme « CNR » et en dehors du domaine d'applicabilité ; ils ne peuvent donc pas être évalués avec la méthode OptiSafe Eye Irritation Test. Pour les échantillons d'essai avec un score OS supérieur à 15 et une diminution de 35 % ou plus de la dose la plus élevée à la dose la plus basse, le résultat est « aucune prédiction ne peut être faite ».

19. Les valeurs associées aux produits chimiques étalons et aux deux substances QC doivent se situer dans les plages prédéfinies indiquées dans le Tableau 3 ci-dessous. En outre, le score OS de QC1 doit être inférieur à 4 et celui de QC2 supérieur à 15.



**Tableau 3. Critères d’acceptabilité des produits chimiques étalons et des substances QC dans la méthode OptiSafe Eye Irritation Test™**

| Plage d’acceptabilité de la DO <sub>400</sub> |                          |
|---|--------------------------|
| Étalon 0                                      | 0.100–0.290              |
| Étalon IV                                     | > Étalon 0, < Étalon III |
| Étalon III                                    | 0.300–0.600              |
| QC1   | 0.175–0.275              |
| QC2   | 0.300–0.875              |

**Liste de contrôle d’assurance qualité**

1. Contrôler les feuilles de saisie des données de l’essai préliminaire et de l’essai principal pour vérifier que la documentation est complète. Vérifier notamment les points suivants :
2. - le score QC1 est inférieur à 4 et le score QC2 supérieur à 15 ;
3. - le score OS le plus haut a bien été utilisé pour prédire le potentiel d’irritation de la substance d’essai ;
4. - la courbe dose-réponse a été évaluée et les résultats sont conformes aux critères prédéfinis ;
5. - la température de l’incubateur au début et à la fin de l’incubation a bien été consignée sur la feuille de saisie des données et était bien comprise entre 30.6 °C et 31.3 °C ;
6. - si trois tampons de blanc (TB) ou plus sont supérieurs à 2 000, le résultat est « CNR » ;
7. - si quatre ou cinq puits d’essai (contenant la solution d’agent actif) dépassent la plage supérieure du spectrophotomètre (> 3 000), le résultat est « CNR » ;
8. - le kit de la méthode d’essai OS a bien été utilisé avant sa date de péremption, qui doit être consignée avec le numéro de lot sur la feuille de saisie des données.

**Interprétation des résultats et modèle de prédiction**

20. Le score OS le plus élevé est ensuite utilisé pour prédire le potentiel de danger que le produit chimique d’essai représente pour les yeux d’après le SGH de l’ONU (Tableau 4).

**Tableau 4. Modèle de prédiction de la classe SGH de la méthode OptiSafe Eye Irritation Test™**

| Score OS | Prédiction de la classification dans le SGH de l’ONU*,** |
|----------|--|
| ≤ 15     | Sans catégorie   |
| > 15     | Aucune prédiction ne peut être faite                     |

SGH = Système général harmonisé de classification et d’étiquetage des produits chimiques.

\*Si le résultat obtenu pour le produit chimique d’essai est CNR (« critères non remplis »), il n’est pas possible d’établir une prédiction concernant la classification selon le SGH de l’ONU.

\*\*Au moment d’établir une classification, il convient de tenir compte de tous les mécanismes de toxicité oculaire

possibles et pertinents pour un produit chimique d'essai donné, en fonction des données et connaissances existantes, comme indiqué dans le document-guide 263 (5).

## RAPPORT D'ESSAI

### *Produits chimiques d'essai et témoins*

- identification du produit chimique, notamment numéro(s) CAS, formule structurale et/ou autres identifiants, selon les données disponibles ;
- pureté et composition du produit (substance ou mélange) d'essai [en pourcentage(s) par unité de poids], selon les données disponibles ;
- propriétés physicochimiques pertinentes pour la conduite de l'étude, notamment état physique, pH, stabilité et solubilité, comme décrit dans le protocole ;
- pH du produit chimique d'essai, mesuré lors de l'essai préliminaire, comme décrit dans le protocole ;
- résultat de l'essai préliminaire de moussage sur tensioactif ;
- traitement du produit chimique avant l'essai (p. ex. chauffage ou broyage), le cas échéant ;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

### *Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai*

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude

### *Conditions de la méthode d'essai*

- description du système d'essai utilisé (paragraphe 14 ou équivalent) ;
- procédure utilisée pour garantir la performance (c'est-à-dire la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (p. ex. scores OS historiques pour QC1 et QC2 et/ou essais périodiques de substances d'épreuve des compétences).

### *Mode opératoire*

- nombre de doses d'essai (cinq doses pour la méthode OS) et concentration ;
- identifiants des témoins étalons (QC1 = 20 % glycérol, n° CAS 56-81-5 ; QC2 = éthanol, n° CAS 64-17-5) ;
- dose, application et temps d'exposition du produit chimique d'essai utilisé (voir les PMPC spécifiques) ;
- description de toute modification éventuelle du protocole.

### *Résultats*

- mesures OD<sub>400</sub> et scores OS du produit chimique d'essai ;
- mesures OD<sub>400</sub> et scores OS des produits chimiques étalons et des substances QC ;
- calculs ;
- résultat des vérifications des critères d'acceptabilité ;
- résultats des nouveaux essais, le cas échéant ;
- description de tout écart ou de tout autre effet observé durant la procédure ;
- score OS final le plus élevé et prédiction de classification dans le SGH de l'ONU.

### *Discussion des résultats*

### *Conclusion*

**Appendice B – Références**

## Appendice B – Annexe 1

### Produits chimiques de compétence pour la méthode OptiSafe Eye Irritation Test™

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en identifiant correctement la classification des dangers pour l'œil des 12 produits chimiques d'épreuve de compétence recensés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 :** Produits chimiques recommandés pour faire la preuve de la compétence technique relative à la méthode OptiSafe Eye Irritation Test

| Nom chimique                     | N° CAS    | Fournisseur | Référence | Pureté (%) | Catégorie du SGH <i>in vivo</i> | État physique | PMP C | Score d'irritation OS (moyenne ± écart-type) | Prédiction OS                        |
|----------------------------------|-----------|-------------|-----------|------------|---------------------------------|---------------|-------|--|--------------------------------------|
| Méthylpentynol                   | 77-75-8   | SiAl        | 137561    | 98         | 1                               | L             | MA    | 76.2 ± 7.1                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| Cyclohexanol                     | 108-93-0  | SiAl        | 105899    | 99         | 1                               | L             | MA    | 66.9 ± 4.9                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| Thioglycolate de méthyle         | 2365-48-2 | SiAl        | 108995    | 95         | 1                               | L             | MA    | 82.7 ± 6.5                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| Hydrochlorure de prométhazine    | 58-33-3   | SiAl        | P4651     | n/d        | 1                               | S             | MA    | 152.9 ± 19.1                                 | Aucune prédiction ne peut être faite |
| n-octanol                        | 111-87-5  | SiAl        | 297887    | > 99       | 2A                              | L             | MA    | 18.9 ± 0.9                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| Nitrate d'ammonium               | 6484-52-2 | SiAl        | A3795     | n/d        | 2A                              | S             | MA    | 20.7 ± 0.7                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| 2-méthyl-1-pentanol              | 105-30-6  | SiAl        | 214019    | 99         | 2B                              | L             | MA    | 33.2 ± 3.5                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| Acétate de méthyle               | 79-20-9   | SiAl        | 45999     | 99.8       | 2A                              | L             | MA    | 23.9 ± 2.5                                   | Aucune prédiction ne peut être faite |
| Triéthylène glycol               | 112-27-6  | SiAl        | 95126     | > 99       | NC                              | L             | MA    | 5.1 ± 1.7                                    | Sans catégorie                       |
| Sulfate de n,n-diméthylguanidine | 598-65-2  | SiAl        | 276669    | 97         | NC                              | S             | MA    | 12.5 ± 1.0                                   | Sans catégorie                       |

| Nom chimique           | N° CAS    | Fournisseur | Référence | Pureté (%) | Catégorie du SGH <i>in vivo</i> | État physique | PMP C | Score d'irritation OS (moyenne ± écart-type) | Prédiction OS  |
|------------------------|-----------|-------------|-----------|------------|---------------------------------|---------------|-------|--|----------------|
| 2,4-pentanediol        | 625-69-4  | SiAl        | 156019    | 98         | NC                              | L             | MA    | 10.2 ± 0.7                                   | Sans catégorie |
| 1-bromo-4-chlorobutane | 6940-78-9 | SiAl        | B60800    | 99         | NC                              | L             | MA    | 4.7 ± 2.1                                    | Sans catégorie |

## Appendice B – Annexe 1

## DÉFINITIONS

**Précision** : egré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé à la place de « concordance », pour exprimer la proportion de résultats corrects obtenus avec la méthode d'essai (7). Nombre de produits chimiques d'essai pour lesquels une prédiction correcte a été établie divisé par le nombre total de produits chimiques d'essai  $[(VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)]$ .

**Activateur** : solution utilisée pour déclencher la formation de la matrice macromoléculaire ordonnée lors de la réhydratation des protéines.

**Agent actif** : matrice macromoléculaire de la méthode d'essai OptiSafe Eye Irritation Test (OS).

**Produit chimique de référence** : substance utilisée comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique de référence présente les propriétés suivantes : (i) source(s) régulière(s) et fiable(s) ; (ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des produits chimiques à soumettre à l'essai ; (iii) caractéristiques physiques et chimiques connues ; (iv) données confirmant les effets connus ; et (v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

**Témoin tampon de blanc** : solution témoin utilisée pour soustraire le signal de fond dû au produit chimique d'essai à la mesure de la DO dans le système d'essai.

**Approche « bottom-up »** : approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif) (4) (5).

**Substances étalon** : quatre solutions irritantes déterminées (étalons 0, 1, 2 et 3) dont les scores d'EID sont bien caractérisés dans la méthode d'essai Ocular Irritation<sup>®</sup>. Les substances étalon permettent d'établir une courbe d'étalonnage à comparer aux résultats obtenus avec la méthode d'essai, et garantissent une performance optimale.

**Essai CiF (Complètement insoluble – Flotte)** : procédure de manipulation physicochimique (PMPC) pour les produits chimiques d'essai solides dans laquelle le produit chimique d'essai flotte pendant l'essai préliminaire (contrôle d'insolubilité complète).

**Essai CiC (Complètement insoluble – Coule)** : procédure de manipulation physicochimique (PMPC) pour les produits chimiques d'essai solides dans laquelle le produit chimique d'essai coule pendant l'essai préliminaire (contrôle d'insolubilité complète).

**Cornée** : partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

**Critères non remplis (CNR)** : un produit chimique d'essai est considéré comme ne remplissant pas les critères si trois tampons de blanc (TB) ou plus sont supérieurs à 2 000 et/ou si quatre ou cinq puits d'essai (contenant la solution d'agent actif) dépassent la plage supérieure du spectrophotomètre (> 3 000). Le résultat CNR ne peut pas être utilisé pour prédire une classification dans le SGH de l'ONU.

**Irritation oculaire** : production de changements dans l'œil, totalement réversibles, suite à l'application d'un produit chimique ou d'un mélange sur l'œil. Interchangeable avec « Effets réversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 2 du SGH de l'ONU » (11, Appendix A, Références).

**Taux de faux négatifs (TFN)** : proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai. Il est calculé comme suit : nombre de produits chimiques d'essai positifs *in vivo* prédits comme négatifs divisé par le nombre total de produits chimiques d'essai positifs *in vivo* [(FN) / (FN + VP)].

**Taux de faux positifs (TFP)** : proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai. Il est calculé comme suit : nombre de produits chimiques d'essai négatifs *in vivo* prédits comme positifs divisé par le nombre total de produits chimiques d'essai négatifs *in vivo* [(FP) / (FP + VN)].

**Essai H** : essai OS avec ajustement extrême du pH ;  $H > 100$ . Cet essai ne fait pas de distinction entre la catégorie 1 et la catégorie 2 du SGH.

**Test de saponification** : test employé pour déterminer si une substance inconnue doit être soumise à l'essai suivant la procédure applicable aux tensioactifs ou aux non-tensioactifs.

**Essai HMA** : essai sur membrane (MA, *Membrane Assay*) avec ajustements modérés du pH ;  $H > 100$  mais  $> 5_A$  ou  $> 5_B$ .

**Danger** : propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

**Solution de réhydratation** : solution utilisée pour réhydrater le réactif en poudre et faciliter la formation de la matrice ordonnée de protéines.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, approche intégrée en matière d'essais et d'évaluation)** : approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'étayer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

**Solution-test d'inhibition** : substance irritante connue pour réagir rapidement avec le réactif macromoléculaire et pour produire une turbidité évidente, utilisée pour vérifier le bon fonctionnement du réactif macromoléculaire lorsque la DO mesurée pour les doses ou concentrations qualifiées d'un produit chimique d'essai est inférieure à celle de l'étalon 2. L'application de la solution-test d'inhibition permet de vérifier que le réactif macromoléculaire dans les puits concernés est toujours en mesure de produire une turbidité évidente (c.-à-d., supérieure à la DO de l'étalon 2) et permet d'identifier les mesures inexactes de DO faible (ou conclusion « non irritant » inexacte) lorsque la turbidité est inférieure à celle mesurée avec l'étalon 2.

**Effets irréversibles sur l'œil** : voir « Lésion oculaire grave » et « Catégorie 1 du SGH de l'ONU ».

**Score d'équivalence Irritation/Draize (EID)** : score chiffré déduit de la comparaison entre la densité

optique mesurée dans la méthode Ocular Irritection® pour une concentration ou dose et la courbe d'étalonnage.

**Score maximal de qualification (SMQ)** : correspond au score d'EID le plus élevé obtenu avec les différentes doses ou concentrations d'un produit chimique testé. Ce score, compris entre 0 et 51, permet de prédire le potentiel d'irritation du produit chimique testé.

**Essai sur membrane (MA, Membrane Assay)** : principal essai OS.

**Membrane circulaire** : membrane semi-perméable qui facilite la maîtrise de l'application du produit chimique dans le mélange réactif de protéines.

**Mélange** : mélange ou solution constitué(e) de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles (11, Appendix A, Références).

**Vérification de la densité optique nette** : fournit une mesure de la densité optique nette par mesure de la DO du réactif activé (solution réactionnelle) et soustraction de la DO du témoin tampon de blanc activé. La DO nette ( $DO_{\text{réactif}} - DO_{\text{blanc}} = DO_{\text{nette}}$ ) doit être  $> -0.015$ .

**Sans catégorie** : produit chimique d'essai qui n'est pas classé comme irritant oculaire (catégorie 2 du SGH de l'ONU) ou comme pouvant provoquer des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU). Interchangeable avec « Non classé selon le SGH de l'ONU ».

**Substances de contrôle qualité** : deux solutions irritantes déterminées (QC1 et QC2) présentant des scores d'EID bien caractérisés compris entre la fourchette basse (7.2-20.8) et la fourchette moyenne supérieure (23.6-35.6) de la méthode Ocular Irritection®. Le contrôle qualité permet de vérifier le bon fonctionnement de la méthode d'essai et de détecter correctement le potentiel d'irritation oculaire dans les fourchettes basse et moyenne/haute d'EID.

**Procédures de manipulation physicochimiques (PMPC)** : protocoles normalisés d'ajustement de l'essai pour les produits chimiques d'essai ayant les propriétés physicochimiques suivantes : pH extrême, insolubilité et moussage (tensioactif).

**Réactif en poudre** : mélange de protéines, de glycoprotéines, de glucides, de lipides et d'éléments à faible masse moléculaire. Lorsqu'on le réhydrate, on obtient une solution qui contient une matrice macromoléculaire ordonnée. Les protéines de la solution subissent des changements de conformation lorsqu'elles sont exposées à un produit chimique irritant.

**Fiabilité** : indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoire ainsi que la répétabilité intralaboratoire (7).

**Effets réversibles sur l'œil** : voir « Irritation oculaire » et « Catégorie 2 du SGH de l'ONU ».

**Sensibilité** : proportion des produits chimiques d'essai positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (7). Elle est calculée comme suit : nombre de produits chimiques d'essai *in vivo* correctement prédits comme positifs divisé par le nombre total de produits chimiques d'essai *in vivo* correctement et incorrectement prédits comme positifs  $[(VP) / (VP + FN)]$ .



**Lésion oculaire grave** : lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique ou d'un mélange sur l'œil, et qui n'est pas totalement réversible. Interchangeable avec « Effets irréversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 1 du SGH de l'ONU » (11).

**Témoin solvant/véhicule** : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour soumettre à l'essai les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissout dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

**Spécificité** : proportion des produits chimiques d'essai négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (7). Elle est calculé comme suit : nombre de produits chimiques d'essai *in vivo* correctement prédits comme négatifs divisé par le nombre total de produits chimiques d'essai *in vivo* correctement et incorrectement prédits comme négatifs [(VN) / (VN + FP)].

**Substance** : élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (11, Appendix A, Références).

**Tensioactif** : aussi appelé agent de surface ; substance et/ou préparation diluée (dans un solvant/véhicule approprié), qui consiste en un ou plusieurs groupes hydrophiles et un ou plusieurs groupes hydrophobes, et qui est capable de réduire la tension de surface d'un liquide et de former des couches monomoléculaires d'étalement ou d'adsorption à l'interface eau/air, ainsi que de former des émulsions, et/ou des microémulsions, et/ou des micelles, et de permettre l'adsorption à l'interface eau/solide.

**Essai sur tensioactif (SA, *Surfactant Assay*)** : essai pour les produits chimiques d'essai identifiés comme tensioactifs lors de l'essai préliminaire (contrôle de moussage).

**Approche « top-down »** : approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif) (4) (5).

**Produit chimique d'essai** : produit chimique (substance ou mélange) soumis à l'essai.

**Stratégie d'essai à plusieurs niveaux** : démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification des dangers, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée (4 Appendix A, Références) (5 Appendix A, Références).

**SGH (de l'ONU)** : Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies. Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la

communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (11).

**Catégorie 1 du SGH de l'ONU** : voir « Lésion oculaire grave » et/ou « Effets irréversibles sur l'œil ».

**Catégorie 2 du SGH de l'ONU** : voir « Irritation oculaire » et/ou « Effets réversibles sur l'œil ».

**Non classé selon le SGH de l'ONU** : produit chimique ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU. Interchangeable avec « Sans catégorie ».

**Méthode de référence validée (MRV)** : la ou les premières méthodes approuvées comme scientifiquement valides et utilisées pour mettre au point les Lignes directrices et normes de performance correspondantes. Dans les études de validation axées sur la performance, la ou les MRV sont considérées comme des méthodes de référence auxquelles sont comparées les méthodes d'essai similaires ou modifiées.

**Poids de la preuve** : prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le potentiel de danger d'un produit chimique et d'étayer cette conclusion.