



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

4 juillet 2023

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

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

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

#### INTRODUCTION

1. La méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritation (OI®) est une méthode biochimique *in vitro* qui peut être utilisée pour identifier des produits chimiques (substances et mélanges) susceptibles d'induire des lésions oculaires graves, ainsi que des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves.
2. La(les) méthode(s) décrites dans la présente Ligne directrice ne peuvent pas être utilisées toute(s) seule(s) pour remplacer le test de Draize *in vivo* pour prédire la gamme complète de potentiel irritant pour les différentes classes de produits chimiques. Il est recommandé de recourir à l'utilisation de stratégies d'essai alternatives telles que celles décrites dans les Lignes directrices 467 et 492B 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 (2)(3) pour décider d'une classification dans une catégorie de danger telles que définies 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 (2) (3).

3. La méthode macro-moléculaire *in vitro* est une méthode d'essai pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières décrites aux paragraphes 7 à 12, pour classer et étiqueter les produits chimiques en fonction de leur caractère dangereux pour l'œil. Alors qu'elle n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin, la méthode macro-moléculaire *in vitro* est recommandée comme première étape d'une stratégie « top-down » telle que décrite dans le Document d'orientation 263 de l'OCDE (2) pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, sans essai supplémentaire (1). La méthode macro-moléculaire *in vitro* 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 ») (1), et peut donc être utilisée comme première étape dans le cadre d'une stratégie d'essai « bottom-up » (Document d'orientation 263 de l'OCDE) (2). Toutefois, un produit chimique qui, avec cette méthode, n'est pas identifié comme provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) ou 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 (2).

4. L'objectif de la présente Ligne directrice est de décrire la procédure d'évaluation du danger potentiel d'un produit chimique testé suivant la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro*. L'opacité cornéenne est considérée comme le principal critère de classification des dangers pour l'œil (4). L'opacité peut être provoquée par les effets perturbateurs des produits chimiques testés 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 (3). La méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* exploite un mélange réactif macro-moléculaire composé de protéines, de glycoprotéines, de glucides, de lipides et d'éléments à faible poids moléculaire qui, une fois réhydraté, forme une matrice macro-moléculaire complexe qui reproduit la structure hautement organisée et transparente de la cornée (5, 6). Les produits chimiques dangereux pour l'œil provoquent une turbidité du réactif macro-moléculaire par dénaturation, dépliement et changement de conformation des protéines, mais aussi par perturbation et désagrégation des éléments macro-moléculaires 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 macro-moléculaire 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 testé donné, en fonction des données et connaissances existantes, tel que décrit dans le Document d'orientation 263.

5. L'essai Ocular Irritation<sup>®</sup> est la première méthode d'essai macro-moléculaire validée pour l'identification de produits chimiques testés 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). Des normes de performance (7) permettent de simplifier la validation de méthodes d'essai macro-moléculaires *in vitro* nouvelles ou modifiées et similaires à l'essai Ocular Irritation<sup>®</sup>, conformément aux principes énoncés dans le Document d'orientation 34 (8), 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.

6. Dans la présente Ligne directrice, le terme « produit chimique testé » désigne ce qui est testé et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode macro-moléculaire *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

7. La méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritation® a été soumise à une étude de validation indépendante entre 2009 et 2012 (9), 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 validation de méthodes alternatives (EURL ECVAM) (10). 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 macro-moléculaire en poudre, et à sa stabilité dans le temps. Au total, 89 produits chimiques testés 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 ne relevaient d'aucune catégorie 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 entre, ou égal à, 4 et 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.

8. Des limites spécifiques ont été relevées dans les données internes issues de versions de l'essai macro-moléculaire ou d'études de validation antérieures (11), concernant certains produits chimiques qui entrent dans le domaine d'applicabilité défini au paragraphe 7 (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 macro-moléculaire, détectée par des mesures spécifiques de DO<sub>405</sub> pour certains témoins et produits chimiques testés (paragraphe 22-23), ou d'observations spécifiques au système d'essai qui constituent une partie intégrante du rapport et de l'analyse des résultats (paragraphe 25). Les critères d'acceptabilité de l'essai spécifiés aux paragraphes 22 et 23 et intégrés dans le logiciel fourni, garantissent le suivi et la détection de ces phénomènes limitants.

9. La Ligne directrice s'applique aux substances et aux mélanges. Toutefois, avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques et substances difficiles à tester (parce qu'instables ou polymérisables, telles que celles 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 testés. 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 d'orientation 263 de l'OCDE (2).

10. La performance de la méthode d'essai macromoléculaire 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 participant, tel que le recommande le comité Scientifique

Consultatif de l'EURL-ECVAM (ESAC) (10)<sup>1</sup> Utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* présente une précision d'ensemble de 75 % (66.5/89), une spécificité de 81 % (55.8/69), une sensibilité de 54 % (10.7/20), un taux de faux positifs de 19 % (13/68) et un taux de faux négatifs de 50 % (10/20), en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur les yeux de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (1)(9), les résultats de ce dernier test présentant leur propre degré d'incertitude, comme résumé dans le Document d'orientation 263 (2). 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 testés qui donnent des résultats négatifs feront ensuite l'objet d'un ou 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 d'orientation 263 de l'OCDE (2).

11. Utilisée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* présente une précision d'ensemble de 75 % (67/89), 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 système de classification du SGH de l'ONU (1)(9), les résultats de ce dernier test présentant leur propre degré d'incertitude, comme résumé dans le Document d'orientation 263 (2). 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 le système de classification du SGH de l'ONU (1)(9). 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 seront ultérieurement testés au moyen d'une autre méthode *in vitro* validée, ou en dernier ressort chez le lapin, en fonction des exigences réglementaires, selon une stratégie d'essai séquentielle et selon le faisceau de preuves, comme indiqué dans le Document Guide No. 263 92). On notera que, conformément à l'approche IATA décrite dans le Document d'orientation 263 de l'OCDE (2), 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 figure 1, partie 2 du Document d'orientation 263 de l'OCDE).

---

<sup>1</sup> Performance calculée basée sur la majorité des résultats est comparable (9) (10).

12. La méthode macro-moléculaire *in vitro* n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques testés devant être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques testés devant être classés comme 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 recherches d'informations ou des essais complémentaires suivant d'autres méthodes sont nécessaires, conformément au Document d'orientation sur les IATA (2).

## PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritection® comprend deux éléments : une matrice macro-moléculaire et une membrane circulaire servant à maîtriser l'application du produit chimique testé à la matrice macro-moléculaire. Ce système biochimique acellulaire ne permet pas d'étudier le rôle de la cytotoxicité dans la toxicité oculaire. La matrice macro-moléculaire est la cible du produit chimique testé ; 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 macro-moléculaire forme une structure hautement organisée transparente. Il est communément admis que les produits chimiques testés 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 testés 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 macro-moléculaire. 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 Irritection/Draize (EID) pour chaque dose ou concentration du produit chimique testé (voir les précisions au paragraphe 19). Le score d'EID le plus élevé entre cinq doses ou concentrations d'un produit chimique testé 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 22).

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

14. Pour tout laboratoire mettant en œuvre la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* pour la première fois, la liste des produits chimiques d'épreuve de compétence est fournie à l'annexe 3. Il peut utiliser ces substances pour démontrer sa compétence technique en matière d'application de la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* préalablement à la soumission des données obtenues avec cet essai à des fins de classification réglementaire des dangers.

## MODE OPÉRAIRE

15. L'essai Ocular Irritection® est pour le moment la seule méthode macro-moléculaire *in vitro* couverte par la présente Ligne directrice. Un protocole est disponible et il convient de l'appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai en laboratoire (11). Les paragraphes qui suivent

décrivent les éléments et procédures principaux de la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro*, issus du protocole d'Ocular Irritection®.

### **Caractérisation du produit chimique testé**

16. On mesure le pH d'une solution à 10 % du produit chimique testé 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 (11). En outre, les produits chimiques testés dont les propriétés tensioactives ne sont pas clairement identifiées sont soumis au test de saponification décrit dans le protocole (11), afin de déterminer la meilleure procédure d'application du produit chimique testé parmi celles décrites au paragraphe 18. 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 testé est mélangée pendant 10 secondes au vortex (11).

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

17. La base de la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritection® est la préparation d'une matrice macro-moléculaire. 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, entre 7,9 et 8,2 ; pour la température, entre 20 et 25°C. De plus, la solution de réactif obtenue (ainsi que le tampon de blanc testé en parallèle pour chaque dose ou concentration testée) 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 macro-moléculaire 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 dans le système Ocular Irritection®), à température ambiante (20-25°C). La solution réactionnelle de la matrice de protéines est transférée par aliquotage dans une plaque à 24 puits.

### **Application des produits chimiques testés**

18. Les produits chimiques sont testés à température ambiante (20-25°C) directement sur la matrice macro-moléculaire ou sur une membrane de cellulose, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Annexe 2A, figure 1). Pour les produits chimiques testés solides, non tensioactifs, ou les produits inconnus identifiés comme ne possédant pas de propriétés tensioactives ou affines d'après le test de saponification décrit au paragraphe 16 et dans le protocole d'essai (11), cinq doses (25, 50, 75, 100 et 125 µl pour les liquides ou mg pour les solides) sont appliquées tel quel à la membrane circulaire positionnée sur la solution réactionnelle (matrice). Les solides peuvent être broyés pour assurer la répartition homogène du produit chimique testé sur toute la surface de la membrane. Pour les produits chimiques tensioactifs connus, et les produits inconnus identifiés comme possédant des propriétés tensioactives ou affines d'après le test de saponification (11), on prépare une solution de travail dans l'eau distillée à 5 %, puis l'on procède à une série de cinq dilutions aux 1/2 (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 macro-moléculaire activée), puis on recouvre les puits avec la membrane circulaire (Annexe 2a). Les cires solides (morceaux) sont appliquées sans dilution directement sur la solution réactionnelle et recouverts avec la membrane circulaire (Annexe 2a).

19. La matrice macro-moléculaire de la méthode Ocular Irritection® est exposée aux produits chimiques testés et aux témoins parallèles pendant  $24,0 \pm 0,5$  h, dans un incubateur à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . 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 (11)), 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 testé est considéré comme exclu du champ d'applicabilité ou incompatible avec la méthode.

### ***Produits chimiques témoins***

20. Les témoins sont testés en parallèle du produit chimique. Dans le cas de l'essai Ocular Irritation®, il s'agit de quatre substances étalon et de deux témoins de contrôle qualité (substances QC) fournis dans le kit commercialisé (voir définitions à l'annexe 1). Les substances étalon comprennent quatre produits chimiques classés de « sans catégorie » à « catégorie 1 » selon le SGH de l'ONU (1) 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 Irritation/Draize (EID) (voir paragraphe 21 et 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***

21. Après l'incubation, les produits chimiques testés et les témoins sont transférés dans une plaque à 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 (11). On mesure la DO brute de chaque puit et on calcule les score d'EID pour les substances QC et produits chimiques testés à l'aide du logiciel et des formules présentés à l'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 de contrôle qualité (paragraphe 22), ainsi que les aspects dose-réponse générés avec les cinq doses/concentrations de produit chimique testé (paragraphe 23).

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

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

22. Les résultats qualifiés de la MRV Ocular Irritation® 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

23. 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 testé (voir paragraphe 24). Les résultats d'un réplicat qualifié peuvent être exclus après les vérifications suivantes :

- Vérification de la densité optique nette : la DO<sub>x</sub> nette d'un produit chimique testé doit être supérieure à la valeur pré-établie (soit > -0,015). Si la DO<sub>x</sub> nette d'un produit chimique testé 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>x</sub> nette d'un produit chimique testé 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 macro-moléculaire 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>x</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 testé (quelle qu'elle soit) indique une interférence du produit chimique testé (c.-à-d., une coloration intense). Le produit chimique concerné peut être testé 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 testé 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 testé, 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 (8).

### **Interprétation des résultats et modèle de prédiction**

24. En comparant la densité optique (DO<sub>405</sub>) qualifiée d'un produit chimique testé à la courbe d'étalonnage (obtenue avec les étalons), on déduit le score d'équivalence Irritection/Draize (EID) pour chaque dose ou concentration testée. 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 testé représente pour les yeux d'après le SGH de l'ONU (1). Dans le cas de la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritection®, 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

Note :

\* 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 10) et leur potentiel de danger a donc été sous-estimé avec l'essai macro-moléculaire. 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 11). 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 d'orientation relatif aux IATA (2).

\*\* 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 testé donné, en fonction des données et connaissances existantes, tel que décrit dans le Document d'orientation 263 (2).

### Rapport d'essai

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

#### *Produits chimiques testés 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 testé/substance témoin ou mélange [en pourcentage(s) par unité de poids], dans la mesure où cette information est disponible ;
- pour les substances multi-constituants 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 physico-chimiques (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 testé déterminé conformément au protocole (11) ;
- résultat du test de saponification si les propriétés tensioactives ne sont pas précisées par le fournisseur du produit chimique testé ;
- traitement du produit chimique testé 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 testé ;
- 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*

## BIBLIOGRAPHIE

1. United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Available at: [https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev07/English/03e\\_part3](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3) .
2. OECD (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)
3. 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.
4. Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel M., De Smedt A., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Templier M., McNamee P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Archives of Toxicology* 91, 521-547.
5. Gordon V (1992). The scientific basis of the EYTEX™ system. *ATLA* 20, 537-540
6. Kelly C (1989). EYTEX An *in vitro* method of predicting ocular toxicity. *Pharmacopeial forum*, p 4815
7. OECD (2019). Series on Testing and Assessment No. 312: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Macromolecular Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.
8. OECD (2005). OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
9. Eskes C, Hoffmann S, Facchini D, Ulmer R, Wang A, Flego M, Vassallo M, Bufo M, van Vliet E, d'Abrosca F, Wilt N (2014). Validation Study on the Ocular Irritection® Assay for Eye Irritation Testing. *Toxicology In vitro* 28, 1046-1065.
10. ESAC (2016). EURL ECVAM Scientific Advisory Committee Opinion on the Ocular Irritection® test method for prediction of serious eye damage/ eye irritation potential of chemicals. ESAC Opinion No. 2016-01 of 24 June 2016; EUR 28174 EN; doi:10.2787/991443. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103703>.
11. DB-ALM (INVITTOX) (2013). Protocol 157: Ocular Irritection® Assay System, 25pp. Available: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>.
12. Eskes C. (2010). Guidance Document on the Application of Alternative methods in the Regulatory Assessment of Chemical Safety Related to Human Eye Irritation and Severe Irritation: Current Status and Future Prospects. FOPH, 65 pp. Available at: <http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00253/03225/12694/index.html?lang=fr>

13. OECD (2017). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788).

**ANNEXE 1 – DÉFINITIONS**

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

**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).

**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) (2) (3).

**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 ».

**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.

**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.

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

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

**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 intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire (8).

**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.

**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 » (1).

**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 » (1).

**Mélange** : mélange ou solution constitué(e) de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles (1).

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

**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.

**Non classé** : produit chimique testé 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 « Sans catégorie selon le SGH de l'ONU ».

**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 danger potentiel d'un produit chimique et d'étayer cette conclusion.

**Précision** : degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un 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 (26).

**Produit chimique de référence** : substance utilisée comme référence dans une comparaison avec un produit chimique testé. 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 tester ; (iii) caractéristiques physiques et chimiques connues ; (iv) données confirmant les effets connus ; et (v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

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

**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.

**Sans catégorie dans le SGH de l'ONU** : produit chimique ne relevant d'aucune classification selon le SGH pour catégorie 1 ou catégorie 2 (2A ou 2B). Interchangeable avec « Non classé ».

**Score d'équivalence Irritation/Draize (EID)** : score chiffré déduit de la comparaison entre la densité optique mesurée dans la méthode Ocular Irritation® 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.

**Sensibilité** : proportion des produits chimiques testés positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (8).

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

**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 testé 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 inexacts de DO faible (ou conclusion « non irritant » inexacte) lorsque la turbidité est inférieure à celle mesurée avec l'étalon 2.

**Spécificité** : proportion des produits chimiques testés négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (8).

**Stratégie d'essais à plusieurs niveaux** : Démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique testé 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 testé 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 (2) (3).

**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 (1).

**Substances de contrôle qualité** : deux solutions irritantes déterminées (QC<sub>1</sub> et QC<sub>2</sub>) 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 Irritation®. 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.

**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®. 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.

**Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH)** : système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

**Tampon de blanc** : solution témoin utilisée pour soustraire le signal de fond lors des mesures de la DO<sub>405</sub> des produits chimiques testés dans l'essai.

**Taux de faux négatifs** : 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.

**Taux de faux positifs** : 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.

**Témoin de solvant/véhicule** : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique testé afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique testé dissoute 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.

**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.

**Test de saponification** : test employé pour déterminer si une substance inconnue doit être testée suivant la procédure applicable aux tensioactifs ou non-tensioactifs (11).

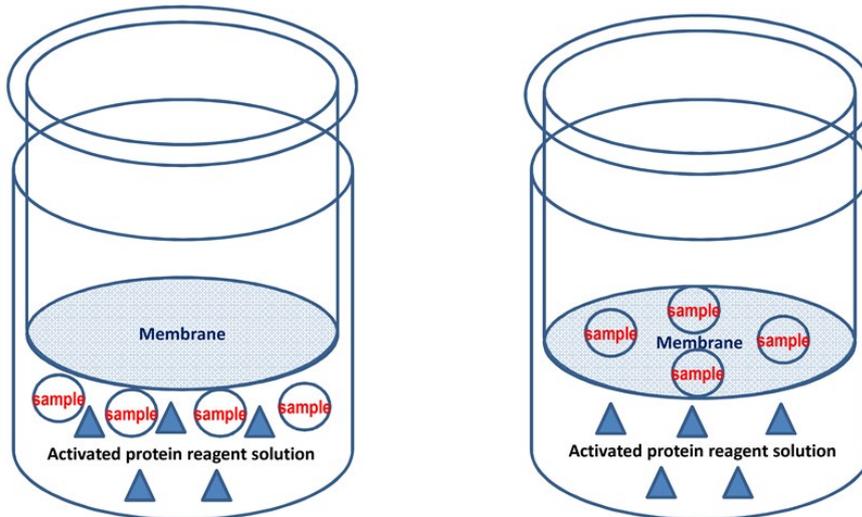
**Vérification de la densité optique nette** : fournit une mesure de la densité optique nette par mesure de la DO du réactif activé (solution réactionnelle) et soustraction de la DO du tampon de blanc activé. La DO nette ( $DO_{\text{réactif}} - DO_{\text{blanc}} = DO_{\text{nette}}$ ) doit être  $> -0,015$ .

ANNEXE 2A

Illustration du paragraphe 18

Application des substances testées

Légende : [échantillon, membrane, solution réactionnelle activée (protéines) / Tensioactifs et cires non-tensioactives / Produits non tensioactifs (excepté cires)]



For surfactant & Non-surfactant Waxy Solid

For Non-surfactant (except waxy solid)

ANNEXE 2B

Détails concernant la détermination du score d'EID par le logiciel (voir paragraphe 21).

Après l'incubation, la DO<sub>405</sub> brute des produits chimiques testés et des témoins est mesurée à l'aide du spectrophotomètre (comme décrit au paragraphe 21) 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 :

$$EID = (DO_{QC1,2} \text{ ou } DO_{\chi} \text{ nette} / DO_{\text{étalon1}}) \times 12,5$$

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

$$EID = [(DO_{QC1,2} \text{ ou } DO_{\chi} \text{ nette} - DO_{\text{étalon1}}) / (DO_{\text{étalon2}} - DO_{\text{étalon1}})] \times 17,5 + 12,5$$

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

$$EID = [(DO_{QC1,2} \text{ ou } DO_{\chi} \text{ nette} - DO_{\text{étalon2}}) / (DO_{\text{étalon3}} - DO_{\text{étalon2}})] \times 21,0 + 30$$

© OCDE (2023)

Si  $DO_x$  nette >  $DO_{\text{étalon}3}$ , 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  $DO_x$  nette pour un produit chimique testé est égale à  $DO_{x\text{réactif}} - DO_{x\text{blanc}}$ , et sert à éliminer le signal dû au tampon seul dans la mesure de DO du produit chimique.**

Où :

$x$  est la dose ou la concentration du produit chimique testé.

$DO_{\text{réactif}}$  est la DO mesurée dans le puits contenant le produit chimique testé et la solution réactionnelle.

$DO_{\text{blanc}}$  est la DO mesurée dans le puits contenant le produit chimique testé dans une solution tampon.

$DO_{QC1,2}$  et  $DO_{\text{étalon}0,1,2,3}$  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.

### ANNEXE 3 – SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI MACRO-MOLÉCULAIRE *IN VITRO*

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente Ligne directrice pour les essais, les laboratoires démontrent 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 macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritation<sup>®</sup> fournis constituent des exemples tirés des résultats obtenus pendant l'étude de validation (9). Comme recommandé dans le Document d'orientation 34 de l'OCDE<sup>2</sup>, la sélection comprend, autant que possible, des produits chimiques correspondant aux critères suivants : (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) (4)(11) ; (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 (9) ; (v) couvrent la gamme des réponses *in vitro* d'après des données de haute qualité issues de la méthode Ocular Irritation<sup>®</sup> (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 macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritation<sup>®</sup>, ou un produit chimique de référence figurant dans les normes de performances (OECD, 2019) (7)(9). Ces changements doivent cependant être justifiés.

---

<sup>2</sup> Document Guide de l'OCDE No. 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 démontrer les compétences techniques relatives à la méthode d'essai macro-moléculaire *in vitro* Ocular Irritection®**

Nom chimique	N° CAS	SGH de l'ONU <i>in vivo</i>	État physique	pH <sup>A</sup>	plage SMQ / n = réplicats Moyenne (ET)	Prédiction avec la MRV (7)
2-Méthylrésorcinol	608-25-3	Catégorie 1	Solide	5.8	> 51/ n = 9 n.d. (n.d.)	Catégorie 1
4-tert-Butylpyrocatechol	98-29-3	Catégorie 1	Solide	5.5	> 51/ n = 9 n.d. (n.d.)	Catégorie 1
Chlorure de benzalkonium (5 %)	63449-41-2	Catégorie 1	Liquide	6.5	49.5/ n = 1 n.d. (n.d.)	Catégorie 1 <sup>C</sup>
Hydrochlorure de prométhazine	58-33-3	Catégorie 1	Solide	4.5	> 51/ n = 9 n.d. (n.d.)	Catégorie 1
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Catégorie 2A	Solide	4.8	14.1-27.3/ n = 12 20.2 (3.0)	Aucune prédiction ne peut être faite
Bromure d'hexadécylpyridinium (1 %)	140-72-7	Catégorie 2A	Liquide	4.7	15/ n = 1 n.d. (n.d.)	Aucune prédiction ne peut être faite <sup>C</sup>
Acétate de méthyle	79-20-9	Catégorie 2A	Liquide	6.8	15.0-21.1/ n = 12 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 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 8.6 (1.0)	Sans catégorie
Bromure d'hexadécylpyridinium (0.1 %)	140-72-7	Sans catégorie	Liquide	7.1	4-12.5/ n = 10 6.8 (1.5)	Sans catégorie
Myristate de myristyle	3234-85-3	Sans catégorie	Solide	6.3	2.7-6.5/ n = 9 4.6 (1.3)	Sans catégorie
Tétrafluoroborate de potassium	14075-53-7	Sans catégorie	Solide	4.5	6.8-19.2/ n = 11 9.9 (2.1)	Sans catégorie

*Notes :*

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 (1).

<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 (11).

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