



Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 438

Méthode d'essai sur oeil de poulet isolé pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves et ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

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 sur œil de poulet isolé pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves et ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

INTRODUCTION

1. La méthode d'essai sur œil de poulet isolé (OPI) a été évaluée par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis, en collaboration avec le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM), en 2006 et 2010 (1) (2) (3). L'évaluation originale a permis de valider scientifiquement l'utilité de la méthode OPI pour le dépistage des produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1) selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) (2) (4). Le nouveau jeu de données *in vitro* et *in vivo* utilisé lors de l'étude de validation a permis de conclure que la méthode OPI peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne relèvent d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave selon la définition du SGH de l'ONU, d'où l'adoption d'une version mise à jour de la LD 438 en 2013 (4) (5). Depuis, les critères de décision appliqués pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification au titre du SGH de l'ONU ont été mis à jour afin de refléter les nouvelles normes d'acceptation (5) (6) (7) (8). En outre, il a été démontré que l'aspect histopathologique est un effet mesuré supplémentaire pertinent pour reconnaître les détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (9) (10). Cette Ligne directrice (adoptée en 2009 et mise à jour en 2013 et en 2018) indique les applications actuellement recommandées et les limites de la méthode OPI au regard de ces évolutions.

2. La(les) méthodes décrites dans la présente Ligne directrice ne peuvent pas être utilisées toute(s) seule(s) pour remplacer le test de Draize *in vivo* (5) 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 méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) et/ou d'une approche intégrée en matière d'essais et d'évaluation (IATA) pourrait remplacer le test oculaire de Draize (7) (11). 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 (7) (11). La méthode OPI est une méthode d'essai *in vitro* pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières décrites aux paragraphes 7 à 11, 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 OPI est recommandée comme première étape d'une stratégie d'essai telle que l'approche « top-down » recommandée dans la LD 263 de l'OCDE (7) 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 expérience supplémentaire (4). La méthode OPI 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 ») (4), et peut donc être utilisée comme première étape dans le cadre d'une stratégie d'essai telle que l'approche « bottom-up » (OCDE LD 263) (7). Cependant, un produit chimique qui, avec la méthode OPI, semble ne causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification pour irritation oculaire/lésion oculaire grave nécessiterait des informations supplémentaires pour établir une classification définitive. Le choix de la méthode(s) d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette Ligne directrice doivent être envisagées dans le contexte du document d'orientation de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (7). En outre, les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre la méthode OPI dans une approche « bottom-up » dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU.

3. L'objectif de la présente Ligne directrice est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel d'un produit chimique testé pour l'œil, mesuré par la propension du produit chimique à induire ou non une toxicité dans un œil de poulet énucléé. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par (i) une estimation qualitative de l'opacité, (ii) une estimation qualitative des dommages subis par l'épithélium, fondée sur l'application de fluorescéine sur l'œil (rétention de fluorescéine), (iii) une mesure quantitative de l'augmentation de l'épaisseur (gonflement), et (iv) une évaluation qualitative des dommages morphologiques macroscopiques infligés à la surface des yeux traités. L'opacité cornéenne, le gonflement et l'estimation des dommages après exposition à un produit chimique testé sont évalués individuellement, puis combinés pour établir une classification d'effet irritant pour les yeux. De plus, un examen histopathologique peut éventuellement être utilisé comme effet mesuré supplémentaire, afin d'améliorer la qualité de la prédiction relative aux détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (voir paragraphes 8 et 56).

4. Les définitions des termes utilisés sont données à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. Cette Ligne directrice est fondée sur le mode opératoire suggéré dans le document d'orientation 160 de l'OCDE (12), adopté pour la première fois en 2011 et mis à jour en 2017 et 2018. Le mode opératoire s'appuie sur des informations dérivées de protocoles publiés (13) (14) (15) (16) (17).

6. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude d'évaluation sous-tendant cette Ligne directrice ont porté sur un large éventail de produits chimiques et la base de données utilisée comporte 184 produits chimiques testés dont 75 substances et 109 mélanges (5). La présente Ligne directrice peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des émulsions et des gels. Les liquides peuvent être aqueux ou non ; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation.

7. La méthode OPI peut être utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce but, cette méthode présente pour limites un taux élevé de faux positifs pour les alcools et un taux élevé de faux négatifs pour les matières solides et les tensioactifs (1) (3) (18). De plus, il existe un risque de sous-estimation du danger posé par les produits chimiques testés ayant des effets *in vivo* durables et de faible gravité (22). Toutefois, le taux de faux négatifs (produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU mais identifiés comme n'en relevant pas) n'est pas préoccupant dans ce contexte car tous les produits chimiques testés qui donnent des résultats négatifs feraient 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. En outre, il a été démontré que l'aspect histopathologique est un effet mesuré supplémentaire pertinent pour réduire le taux de faux négatifs dans l'identification des détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU et pour lesquels des effets *in vivo* durables et de faible gravité ont été démontrés (9) (10) (19). Concernant les solides, il convient de relever que ceux-ci peuvent entraîner des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation de l'œil *in vivo* de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (20). Les investigateurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un résultat positif indique un effet provoquant des lésions oculaires graves, autrement dit de classer le produit chimique testé dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire. Toutefois, il convient d'interpréter avec précaution les résultats positifs obtenus avec des alcools, compte tenu du risque de surévaluation.

8. Utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), la méthode OPI (sans examen histopathologique) présente une précision d'ensemble de 83 % (142/172), un taux de faux positifs de 7 % (9/127) et un taux de faux négatifs de 47 % (21/45), 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 (4) (5). Lorsqu'un examen histopathologique est réalisé comme effet mesuré supplémentaire pour identifier les détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, le taux de faux négatifs de la méthode OPI et sa précision s'améliorent (de 64 % à 27 % de faux négatifs (n=22) et de 53 % à 77 % de précision (n=30)), tandis que le taux de faux positifs reste acceptable (de 0 % à 12.5 % de faux positifs (n=8)) (10).

9. La méthode OPI peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave suivant le système

de classification du SGH de l'ONU (4). Cette méthode d'essai peut être utilisée pour tous les types de produits chimiques, un résultat négatif pouvant être accepté pour ne pas de classer un produit chimique pour irritation oculaire et lésion oculaire grave. Cependant, au regard d'un résultat de la base de données de validation, il est possible que les peintures antisalissures contenant des solvants organiques soient sous-évaluées (5).

10. Utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent pas de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, la méthode OPI présente une précision d'ensemble de 88 % (161/184), un taux de faux positifs de 24 % (20/83) et un taux de faux négatifs de 3 % (3/101), en comparaison avec les données de la méthode d'essai *in vivo* sur œil de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (4) (5). Lorsque les produits chimiques testés de certaines catégories chimiques (à savoir, les peintures antisalissures contenant des solvants organiques) sont exclus de la base de données, la précision de l'OPI est de 88 % (159/181), le taux de faux positifs de 24 % (20/83), et le taux de faux négatifs de 2 % (2/99) au regard du système de classification du SGH de l'ONU (4).

11. La méthode OPI n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques testés qui devraient être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou catégorie 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques testés qui devraient 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 un produit chimique testé dans ces catégories, des informations et, au besoin, des tests supplémentaires effectués selon une méthode pertinente sont nécessaires.

12. Tous les modes opératoires sur l'œil de poulet doivent se conformer à la réglementation locale et aux protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal applicables à l'installation d'essai, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. L'usage des précautions universelles de laboratoire est recommandé (21).

13. Si la méthode OPI ne permet pas d'évaluer directement les lésions conjonctivales et de l'iris évaluées par la méthode d'essai d'irritation oculaire chez le lapin, elle porte sur les effets observés sur la cornée qui sont les principaux critères de classification *in vivo* au regard du SGH de l'ONU. À ce sujet, il convient de noter que les effets sur l'iris ont un poids moindre pour la classification des produits chimiques au titre du SGH de l'ONU (8) (22). En outre, et bien qu'il soit impossible d'étudier la réversibilité des lésions cornéennes per se par la méthode d'essai OPI, il a été démontré qu'un examen histopathologique peut contribuer à identifier les produits chimiques testés provoquant des effets irréversibles qui ne sont pas liés à une lésion initiale importante telle que celles provoquées par des détergents à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) (9). Enfin, la méthode d'essai OPI ne permet pas l'évaluation du potentiel de toxicité systémique associé à une exposition oculaire.

14. Cette Ligne directrice sera périodiquement actualisée après examen de nouvelles informations et de nouvelles données. Par exemple, de nouvelles données histopathologiques pourraient être apportées pour les produits chimiques testés autres que les détergents et tensioactifs à pH non extrême. En vue de cet éventuel développement, les utilisateurs sont invités à conserver les yeux et à préparer des échantillons pour l'histopathologie en vue d'établir une base de données et des critères de décision susceptibles d'améliorer la précision de cette méthode d'essai. L'OCDE a produit le document d'orientation 160 qui doit être consulté lors de l'utilisation des méthodes d'essai de toxicité oculaire *in vitro* OPI et OPCB et qui intègre des procédures détaillées sur la collecte et le traitement des échantillons pour l'évaluation histopathologique (12).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

15. Tout laboratoire conduisant la méthode OPI standard pour la première fois utilise les substances d'épreuve de compétence mentionnées à l'annexe 2. Il peut utiliser ces substances pour démontrer sa compétence technique en matière d'application de la méthode d'essai OPI standard préalablement à la soumission des données obtenues avec cet essai à des fins de classification réglementaire des dangers. Tout laboratoire qui souhaite réaliser un examen histopathologique sur œil de poulet isolé à des fins de classification réglementaire de détergents et tensioactifs à pH non extrême applique les recommandations et l'atlas OPI fournis dans le document d'orientation 160 de l'OCDE (12). Une formation solide et une évaluation de la compétence et de la transférabilité sont recommandées pour garantir l'homogénéité, la constance et la reproductibilité des observations histopathologiques. De plus, un examen pathologique interne par les pairs est mené conformément aux recommandations en vigueur (23) et au document d'information n°16 de l'OCDE relatif aux exigences en matière de bonnes pratiques de laboratoire pour les examens histopathologiques par les pairs (24), et comme décrit au paragraphe 50. Ce processus d'évaluation par les pairs permet de vérifier et d'améliorer la précision et la qualité des diagnostics et interprétations pathologiques. Pour finir, les substances d'épreuve fournies à l'annexe 3 sont utilisées par les laboratoires pour apporter la preuve de leur compétence technique dans l'analyse des effets histopathologiques sur œil de poulet isolé, avant de soumettre des données histopathologique de la méthode OPI à des fins réglementaires de classification de détergents et tensioactifs à pH non extrême.

PRINCIPE DE L'ESSAI

16. La méthode d'essai OPI est un modèle organotypique qui permet le maintien à court terme d'yeux de poulet *in vitro*. Selon cette méthode, les dommages provoqués par le produit chimique testé sont évalués par détermination du gonflement, de l'opacité et de la rétention de fluorescéine de la cornée. De plus, un examen histopathologique peut être réalisé pour renforcer la sensibilité de la méthode dans l'identification des détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (10). Le gonflement de la cornée est une mesure quantitative, tandis que l'opacité, la rétention de fluorescéine et les changements histopathologiques sont des examens qualitatifs. Chaque mesure est reportée sous forme d'un score quantitatif utilisé pour assigner une catégorie OPI (1 à 4), ou associée à une catégorie qualitative utilisée pour assigner une catégorie de produit chimique dangereux pour l'œil *in vitro*, à savoir, soit la catégorie 1 du SGH de l'ONU, soit « sans catégorie » selon le SGH de l'ONU (se référer aux critères de décision). Cependant, aucune prédiction ne peut être établie pour les produits chimiques testés qui ne relèvent pas de la catégorie 1 du SGH de l'ONU et ne sont pas non plus classés « sans catégorie » selon le SGH de l'ONU d'après les essais OPI (voir paragraphe 11) ; dans cette éventualité, le résultat 'aucune prédiction ne peut être établie' lors du test OPI signifie que des informations supplémentaires sont nécessaires à toute fin de classification (voir référence (7) pour plus de plus amples informations).

Source et âge des yeux de poulet

17. Habituellement, on utilise dans cet essai des yeux prélevés sur des poulets tués en abattoirs pour la consommation humaine, et les animaux de laboratoire sont donc inutiles. On utilise uniquement des yeux d'animaux sains dont l'entrée dans la chaîne alimentaire humaine est autorisée.

18. Aucune étude contrôlée visant à évaluer l'âge optimal des poulets n'a encore été menée, mais l'âge et le poids des poulets habituellement utilisés dans cette méthode d'essai sont ceux des petits poulets couramment traités dans un abattoir de volailles (à savoir, environ 7 semaines et 1.5 – 2.5 kg).

Collecte et transport des yeux au laboratoire

19. Les têtes sont coupées immédiatement après un étourdissement sans cruauté des poulets et incision des cous pour la saignée. Les méthodes d'étourdissement respectueuses du bien-être animal incluent l'étourdissement électrique et l'étourdissement en atmosphère contrôlée dès l'instant où il est prouvé que ces méthodes ne détériorent pas les yeux des poulets (voir paragraphe 21). Il conviendra d'identifier une source locale de poulets proche du laboratoire, afin que le transfert des têtes entre l'abattoir et le laboratoire soit suffisamment rapide pour limiter autant que possible la détérioration et/ou la contamination bactérienne. Il faut réduire au minimum l'intervalle qui sépare la collecte des têtes de poulets et le placement des yeux dans la chambre de surfusion suivant l'énucléation (généralement deux heures) pour assurer le respect des critères d'acceptation de l'essai. Tous les yeux utilisés dans l'essai proviennent d'un groupe d'yeux collectés le même jour.

20. Les yeux étant disséqués au laboratoire, les têtes sont transportées intactes depuis l'abattoir, à température ambiante (généralement entre 18 °C et 25 °C), dans des boîtes en plastique humidifiées par des tissus mouillés d'une solution saline isotonique.

Critères de sélection et nombre d'yeux utilisés dans la méthode OPI

21. Les yeux dont la coloration initiale par la fluorescéine ou le score d'opacité de la cornée sont élevés après énucléation (> 0.5 dans les deux cas) sont rejetés.

22. Chaque groupe de traitement et chaque groupe témoin positif parallèle comprend au moins trois yeux. Le groupe témoin négatif ou le témoin avec solvant (si on utilise un solvant qui n'est pas une solution saline) comprend au moins un œil.

23. Dans le cas des matières solides se révélant « sans catégorie » selon le SGH de l'ONU, il est recommandé de procéder à un second essai sur trois yeux afin de confirmer ou d'infirmer le premier résultat négatif obtenu.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation des yeux

24. Les paupières sont soigneusement excisées en veillant à ne pas endommager la cornée. L'intégrité de celle-ci est évaluée au moyen d'une goutte de fluorescéine sodique à 2 % (p/v) appliquée sur la surface cornéenne pendant quelques secondes, puis rincée par une solution saline isotonique. Les yeux traités à la fluorescéine sont examinés au biomicroscope pour vérifier si la cornée est ou non endommagée (ce qui se traduit par une rétention de fluorescéine et une opacité cornéenne ≤ 0.5).

25. L'œil non endommagé est ensuite énucléé, en veillant à ne pas endommager la cornée. On tire le globe oculaire hors de l'orbite en maintenant fermement la membrane nictitante à l'aide de pinces chirurgicales, et les muscles de l'œil sont coupés avec des ciseaux courbes à pointes

émoussées. Il est important d'éviter de léser la cornée par une pression excessive (artéfacts de compression).

26. Lorsque l'œil est retiré de l'orbite, une portion visible du nerf optique reste attachée. Une fois retiré de l'orbite, l'œil est placé sur un tampon absorbant et la membrane nictitante et le reste des tissus conjonctifs sont découpés.

27. L'œil énucléé est monté dans un clamp (en acier inoxydable ou matériau équivalent) en plaçant la cornée verticalement, et en évitant d'appliquer une pression excessive sur l'œil avec le clamp (la sclère de l'œil de poulet est assez ferme pour qu'une légère pression suffise à maintenir l'œil dans une position correcte). Le clamp est ensuite transféré dans une chambre de l'appareil de surfusion (25). Dans l'appareil de surfusion, les clamps sont placés de telle sorte que la totalité de la cornée soit alimentée par le goutte-à-goutte de solution saline isotonique (3-4 gouttes par minute ou 0.1 à 0.15 ml/min). La température dans les chambres de l'appareil de surfusion est réglée à 32 ± 1.5 °C. L'annexe 4 propose un schéma d'un appareil de surfusion normal et des clamps pour œil, disponibles dans le commerce ou à construire. L'appareil peut être modifié en fonction des besoins d'un laboratoire particulier (par exemple, pour contenir un nombre d'yeux différent).

28. Une fois placés dans l'appareil de surfusion, les yeux sont à nouveau examinés au biomicroscope (Haag-Streit BP900, par exemple) afin de s'assurer qu'ils n'ont pas été endommagés pendant le protocole de dissection. L'épaisseur de la cornée est mesurée à ce moment au sommet de la cornée au moyen du dispositif de mesure dont est muni le biomicroscope. Il faut remplacer les yeux (i) dont la rétention de fluorescéine est > 0.5 , (ii) dont l'opacité cornéenne est > 0.5 ; ou (iii) qui présentent tout autre signe de lésion. Les yeux qui satisfont tous ces critères, mais dont l'épaisseur cornéenne s'écarte de plus de 10 % de la valeur moyenne calculée pour l'ensemble des yeux sont également rejetés. Sur le modèle de biomicroscope Haag-Streit BP900 équipé du dispositif de mesure de l'épaisseur n°1, le réglage de la fente est de $9\frac{1}{2}$ égal 0.095 mm. Il est aussi possible d'utiliser le biomicroscope Haag-Streit BQ900, à condition de pouvoir monter le dispositif de mesure de l'épaisseur et de pouvoir régler une largeur de fente de 0.095 (voir également paragraphe 53). Les utilisateurs tiennent compte du fait que les mesures d'épaisseur de cornée par un biomicroscope varient en fonction du réglage de la largeur de fente.

29. Une fois tous les yeux examinés et admis dans l'étude, ils sont incubés pendant environ 45 à 60 minutes pour s'équilibrer dans le système d'essai avant l'administration du produit chimique testé. Cette période est suivie des mesures au temps de référence zéro de l'épaisseur et de l'opacité cornéenne, qui serviront de mesures initiales (temps 0). Le score de fluorescéine à la dissection est la mesure initiale pour cet effet.

Application du produit chimique testé

30. Immédiatement après les mesures de référence au temps 0, l'œil (dans son support) est retiré de l'appareil de surfusion, placé en position horizontale et le produit chimique testé est appliquée sur la cornée.

31. Les produits chimiques liquides sont généralement testés sans dilution, mais ils peuvent être dilués si besoin est (par exemple, dans une étape du modèle de l'étude). Il est préférable d'utiliser une solution physiologique (isotonique) pour diluer les produits chimiques testés. Il est toutefois possible d'utiliser d'autres solvants en conditions contrôlées, sous réserve de démontrer le bien-fondé de leur utilisation au lieu de la solution physiologique saline.

32. Les produits chimiques liquides sont appliqués sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface ; le volume habituel est de 0.03 ml.

33. Dans la mesure du possible, les produits chimiques solides sont broyés pour obtenir la plus grande finesse au moyen d'un mortier et d'un pilon, ou d'un outil de broyage comparable. La poudre est appliquée sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface ; la quantité habituelle est de 0.03 g.

34. Le produit chimique testé (liquide ou solide) est appliqué pendant 10 secondes, puis éliminé par rinçage de l'œil avec une solution saline isotonique (environ 20 ml) à température ambiante. L'œil (dans son support) est ensuite remis dans l'appareil de surfusion dans la position verticale originelle. En cas de besoin, il est possible d'effectuer un rinçage supplémentaire après l'application de 10 secondes ainsi qu'aux points de mesure ultérieurs (par exemple, si l'on découvre des résidus du produit chimique testé sur la cornée). En général, la quantité de solution saline utilisée en plus pour le rinçage n'est pas importante, contrairement en revanche à l'adhérence observée du produit chimique testé sur la cornée.

Produits chimiques témoins

35. Il convient d'inclure des témoins négatifs ou de solvant/véhicule et des témoins positifs concomitants dans chaque expérience.

36. Dans le cas d'essais de liquides purs ou de solides, on utilise une solution saline physiologique (isotonique) comme témoin négatif parallèle dans la méthode d'essai OPI pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable.

37. Lors des essais de liquides dilués, il convient d'inclure un groupe témoin de solvant/véhicule concomitants dans la méthode d'essai pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable. Comme le mentionne le paragraphe 31, il ne faut utiliser que des solvants ou des véhicules dont l'absence d'effet néfaste sur le système d'essai a été démontrée.

38. Chaque expérience comprend une substance irritante connue en tant que témoin positif parallèle, afin de vérifier l'induction d'une réponse appropriée. Dans cette Ligne directrice, la méthode OPI a pour vocation d'identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves ; le témoin positif est donc un produit chimique de référence provoquant une réponse qui remplit les critères de classification dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU applicables à cette méthode d'essai. Toutefois, afin d'assurer que la variabilité de la réponse du témoin positif au cours du temps peut être évaluée, l'ampleur de la réponse forte ne doit pas être excessive. Les données *in vitro* obtenues pour le témoin positif doivent être suffisantes pour permettre le calcul d'une gamme de réponse acceptable définie statistiquement. S'il n'existe pas de données antérieures adéquates issues de la méthode d'essai OPI pour un témoin positif donné, il peut être nécessaire de mener des études susceptibles de fournir ces informations.

39. L'acide acétique 10 % ou le chlorure de benzalconium 5 % sont des exemples de témoins positifs pour des produits chimiques testés liquides, tandis que l'hydroxyde de sodium ou l'imidazole peuvent jouer ce rôle pour les produits chimiques testés solides.

40. Les substances étalons sont utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus d'une catégorie chimique ou d'une catégorie de produits spécifique, ou pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'une substance irritante pour les yeux dans un intervalle spécifique de réponses irritantes.

Effets mesurés

41. Les cornées traitées sont évaluées avant le traitement et 30, 75, 120, 180, et 240 minutes (± 5 minutes) après le rinçage suivant le traitement. Ces points de mesure sont en nombre suffisant sur la période d'observation de 4 heures et les intervalles entre les mesures permettent d'effectuer les observations requises sur tous les yeux.

42. Les effets mesurés sont l'opacité cornéenne, le gonflement, la rétention de fluorescéine et les effets morphologiques (par exemple, piqûres ou relâchement de l'épithélium). Tous les effets mesurés, à l'exception de la rétention de fluorescéine (qui est déterminée uniquement avant le traitement et 30 minutes après l'exposition au produit chimique testé) sont déterminés à chaque point temporel indiqué ci-dessus.

43. Il est conseillé de prendre des photographies pour illustrer l'opacité cornéenne, la rétention de fluorescéine, les effets morphologiques et, le cas échéant, les observations histopathologiques.

44. Après l'examen final à quatre heures, il est recommandé de conserver les yeux dans un fixateur approprié (par exemple, formol tamponné à pH neutre) en vue d'un éventuel examen histopathologique, notamment pour les détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) (voir paragraphes 7, 14 et 56). Pour mener un examen histopathologique, les yeux sont fixés, découpés, inclus en paraffine, débités en coupes et colorés suivant le protocole sur la collecte et le traitement des échantillons pour l'évaluation histopathologique décrit dans le document d'orientation 160 de l'OCDE (12).

45. Le gonflement cornéen est déterminé par des mesures d'épaisseur de la cornée réalisées au moyen d'un pachymètre optique monté sur un biomicroscope. Il est exprimé en pourcentage et calculé à partir de mesures de l'épaisseur de la cornée selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{épaisseur de la cornée au temps } t - \text{épaisseur de la cornée à } t = 0)}{\text{épaisseur de la cornée à } t = 0} \times 100$$

46. Le pourcentage moyen de gonflement de la cornée pour tous les yeux est calculé à chaque point temporel observé. Une classe OPI est attribuée à chaque produit chimique testé, dérivée du score moyen de gonflement de la cornée le plus élevé observé sur tous les points temporels (paragraphe 53).

47. Le score d'opacité cornéenne est calculé sur la surface de cornée qui est la plus fortement opacifiée par rapport aux observations décrites au tableau 1. La valeur moyenne d'opacité cornéenne pour tous les yeux est calculée pour chaque point temporel observé. Une catégorie OPI est attribuée à chaque produit chimique testé, dérivée du score moyen d'opacité cornéenne le plus élevé observé sur tous les points temporels (paragraphe 53).

Tableau 1. Scores d'opacité cornéenne

Score	Observation
0	Aucune opacité
0.5	Très faible opacité
1	Zones d'opacité dispersées ou diffuses ; détails de l'iris nettement visibles
2	Zone translucide aisément discernable ; détails de l'iris légèrement masqués
3	Forte opacité cornéenne ; aucun détail spécifique de l'iris n'est visible ; la taille de la pupille est à peine discernable
4	Complète opacité cornéenne ; l'iris est invisible

48. La rétention de fluorescéine est évaluée uniquement au point temporel d'observation de 30 minutes par rapport aux scores figurant au tableau 2. La valeur moyenne de rétention de fluorescéine est ensuite calculée pour tous les yeux observés au point d'observation de 30 minutes et utilisée pour attribuer une classe OPI à chaque produit chimique testé (paragraphe 53).

Tableau 2. Scores de rétention de fluorescéine

Score	Observation
0	Pas de rétention de fluorescéine
0.5	Coloration très mineure de cellules individuelles
1	Coloration de cellules individuelles éparées dans toute la zone traitée de la cornée
2	Coloration dense de foyers de cellules individuelles ou de cellules à confluence
3	Grandes zones confluentes de cornée retenant la fluorescéine

49. Les effets morphologiques comprennent la « piqure » de l'épithélium cornéen, le « relâchement » de l'épithélium, la « rugosité » de la surface cornéenne et l'« adhésion » du produit chimique testé sur la cornée. La gravité de ces effets est variable et ils peuvent être observés simultanément. Leur classification est subjective et dépend de l'interprétation de l'observateur.

50. Si un examen histopathologique est réalisé, l'analyse reprend les critères indiqués au tableau 3. Il est indispensable de distinguer les effets dus au traitement des artefacts histopathologiques et/ou de la morphologie préalable, par exemple dans l'évaluation des effets de vacuolisation de l'épithélium. À cette fin, l'atlas fourni à l'annexe 2 du document d'orientation 160 de l'OCDE doit être consulté attentivement (12). De plus, on a recours à des lames originales (plutôt qu'à des microphotographies), car la détection de certains effets requiert une évaluation tridimensionnelle des tissus. Les scores sont attribués uniquement aux effets observés. Aucune information n'est déduite (par exemple, si la couche supérieure de l'épithélium est absente, il est impossible d'attribuer un score pour la vacuolisation dans cette couche). De plus, les effets ou changements à proximité du limbe sont analysés si l'architecture des tissus a été préservée. Cependant, les effets ou changements dans le limbe ne sont pas analysés étant donné qu'ils sont sans lien avec l'exposition chimique. Un examen pathologique interne par les pairs est mené conformément aux recommandations en vigueur (23) et au document d'information n°16 de l'OCDE relatif aux exigences en matière de bonnes pratiques de laboratoire pour les examens histopathologiques par les pairs (24). Dans ce cas, un pathologiste expérimenté (connaissant les

tissus à évaluer) évalue plusieurs lames et les données pathologiques de ses pairs (pour un œil sur trois, par exemple), afin d'aider le pathologiste de l'essai à affiner son diagnostic et son interprétation. Ce processus d'évaluation par les pairs permet de vérifier et d'améliorer la précision et la qualité des diagnostics et interprétations pathologiques. Enfin, une formation solide et une évaluation de la compétence et de la transférabilité sont recommandées pour garantir que les observations histopathologiques sont constantes.

Tableau 3. Scores d'analyse histopathologique semi-quantitative applicable à des yeux de poulet isolés fixés, découpés, inclus en paraffine, débités en coupes et colorés

Paramètre	Observation	Score	Description*
Épithélium : érosion	Très légère	½	De quelques cellules individuelles à la totalité de la seule couche superficielle
	Légère	1	Jusqu'à trois couches érodées
	Modérée	2	Jusqu'à 50 % de l'épithélium est érodé
	Sévère	3	L'épithélium est érodé jusqu'à la membrane basale
Épithélium : vacuolisation <i>Observations séparées pour les couches superficielle, intermédiaire et basale de l'épithélium**</i>	Très légère	½	D'une cellule individuelle à quelques cellules éparses
	Légère	1	Groupes de cellules vacuolisées ou chapelet de cellules à petites vacuoles
	Modérée	2	Jusqu'à 50 % de cellules épithéliales vacuolisées*
	Sévère	3	De 50 à 100 % de cellules épithéliales vacuolisées*
Épithélium : nécrose***	Normal	-	< 10 cellules nécrotiques†
	Très légère	½	10-20 cellules nécrotiques†
	Légère	1	20-40 cellules nécrotiques †
	Modérée	2	Nombreuses cellules nécrotiques mais < 50 % de l'épithélium
	Sévère	3	De 50 à 100 % de cellules épithéliales nécrotiques
Stroma : noyaux pycnotiques††: ††† <i>Partie supérieure et inférieure</i>	Normal	-	< 5 noyaux pycnotiques
	Léger	1	5-10 noyaux pycnotiques
	Modéré	2	> 10 noyaux pycnotiques
Désorganisation des fibres stromales †††	Présente	P	Apparence irrégulière des fibres
Endothélium : nécrose	Présente	P	L'endothélium n'étant constitué que d'une couche, l'attribution d'un score n'est pas pertinente

Notes : On trouvera à l'annexe 2 du document d'orientation 160 de l'OCDE (12) un atlas des microphotographies caractéristiques des OPI non traités et traités qui illustrent les différents effets histopathologies possibles décrits ci-dessus.

*Sur toute la surface de la cornée, sauf pour les produits chimiques testés (les produits solides, par exemple) causant des effets locaux malgré une application homogène du produit chimique conforme au protocole décrit dans la LD 438 de l'OCDE. Dans ce cas, l'évaluation s'appuie sur les effets localisés sur la ou les zone(s) exposée(s).

^{**}Chaque couche superficielle, intermédiaire et basale représente un tiers de l'épithélium, à part égale. Si la couche supérieure est absente, la couche médiane reste considérée comme telle et ne devient pas la nouvelle couche supérieure (voir annexe 2 du document d'orientation 160 de l'OCDE pour plus d'informations (12)).

^{***}Nécrose des cellules et tissus attachés uniquement.

[†]Les cellules nécrotiques sont comptées sur toute la longueur de la cornée (il n'est pas utile de fixer une longueur pour rapporter le nombre de cellules, car la longueur totale de la cornée est constante d'une lame à l'autre, étant donné qu'il n'existe quasiment aucune variation dans la taille des yeux de poulet utilisés ni dans la taille des échantillons examinés au microscope). L'examen repose sur une numération absolue des cellules, de « normal » à « léger », comparée à un pourcentage allant de « modéré » à « sévère ». Cela s'explique par la méthode employée pour l'examen : les cellules nécrotiques sont considérées individuellement. S'il y en a plusieurs, elles sont généralement éparpillées. L'analyse par numération renseigne donc sur l'importance de la nécrose. Cet effet diffère de l'érosion, le premier effet observé à l'examen étant alors l'absence d'une partie de l'épithélium qu'il est raisonnable d'estimer par un pourcentage de tissu absent.

^{††}La méthode OPI comprend déjà une mesure précise de l'épaisseur de la cornée à l'aide d'un biomicroscope. En conséquence, le gonflement du stroma n'est pas examiné séparément pendant l'observation histopathologique qui suit.

^{†††}Les effets mesurés sur le stroma sont (1) les noyaux pycnotiques, pour lesquels on reprend le système de scores de Maurer (2001) qui repose sur ses observations de cornées de lapin après une exposition *in vivo* (description de perte ou nécrose de kératocytes) et (2) une désorganisation des fibres. Concernant l'effet (1), la présence de noyaux pycnotiques n'est observée que rarement et il a été suggéré que l'apparition de noyaux pycnotiques est dépendante de la profondeur de la lésion et/ou du processus d'inflammation de la cornée (*in vivo*). En outre, étant donné la forme allongée des fibroblastes du stroma, des noyaux normaux peuvent être faussement considérés comme pycnotiques, en fonction du type de section pratiqué sur les cellules. Concernant l'effet (2), l'observation et l'attribution d'un score de désorganisation des fibres peuvent être rendues difficiles du fait de l'aspect « naturellement » désorganisé des fibres du stroma. Le traitement de la cornée avant examen au microscope peut également provoquer une désorganisation artificielle des fibres du stroma. Dans les deux cas (noyaux pycnotiques et désorganisation des fibres), ces observations coïncident avec plusieurs effets graves sur la cornée déjà observés au biomicroscope et avec les effets observés dans les couches intermédiaire et/ou basale de l'épithélium.

51. D'après la LD 438 de l'OCDE, les produits chimiques testés doivent être appliqués de façon homogène sur la surface des yeux traités. Si tel est le cas, les produits chimiques testés causent en général des effets homogènes sur la cornée des yeux de poulet isolés et l'analyse porte sur la moyenne des effets histopathologiques pour chaque lame. Cependant, certains produits chimiques testés peuvent causer un effet focal ou multifocal, réduit à quelques foyers malgré une application homogène (c'est le cas pour certains produits chimiques testés solides). Si des effets focaux ou multifocaux sont observés avec la méthode OPI, l'histopathologiste en est informé et l'examen histopathologique porte sur les effets indésirables locaux observés sur la zone d'exposition au produit chimique testé. Qui plus est, en cas d'incertitude (par exemple, en cas d'écart entre les résultats de la méthode OPI et ceux des observations histopathologiques), des lames supplémentaires sont préparées à partir d'autres zones de la cornée, pour vérifier que les effets locaux sont présents dans la section examinée.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

52. Les résultats d'opacité cornéenne, de gonflement et de rétention de fluorescéine sont évalués séparément et aboutissent à la détermination d'une catégorie OPI par effet mesuré. Ces catégories sont ensuite combinées pour prédire la classification *in vitro* de chaque produit chimique testé. De même, si des examens histopathologiques ont lieu, ils sont menés séparément et étudiés conformément aux paragraphes 55 et 56.

Critères de décision

53. Après évaluation de tous les effets, on peut assigner la substance à une catégorie OPI selon un barème prédéterminé. L'interprétation du gonflement de la cornée (tableau 4), de l'opacité (tableau 5) et de la rétention de fluorescéine (tableau 6) au moyen de 4 catégories d'OPI, suit les échelles indiquées ci-après. Il est important de relever que les scores de gonflement cornéen donnés au tableau 4 ne sont applicables que si l'épaisseur est mesurée au moyen d'un biomicroscope Haag-Streit BP900 (ou d'un biomicroscope Haag-Streit BQ900) par un dispositif de mesure de profondeur n 1 avec un réglage de largeur de fente à 9½, soit 0.095 mm. Les utilisateurs tiennent compte du fait que les mesures d'épaisseur de cornée par un biomicroscope varient en fonction du réglage de la largeur de fente.

Tableau 4. Critères de classification OPI pour le gonflement de la cornée

Gonflement moyen de la cornée (%)*	Catégorie OPI
0 à 5	I
> 5 à 12	II
> 12 à 18 (> 75 min après traitement)	II
> 12 à 18 (≡ 75 min après traitement)	III
>18 à 26	III
> 26 à 32 (> 75 min après traitement)	III
> 26 à 32 (≡ 75 min après traitement)	IV
> 32	IV

Note : Score moyen le plus élevé observé sur tous les points temporels

Tableau 5. Critères de classification OPI pour l'opacité

Score moyen maximal d'opacité*	Catégorie OPI
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

Note : *Score moyen maximal observé sur tous les points temporels (à partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 1). *À partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 2.

Tableau 6. Critères de classification OPI pour la rétention moyenne de fluorescéine

Score de rétention moyenne de fluorescéine 30 minutes après traitement*	Catégorie OPI
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

Note : *À partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 2.

54. La classification *in vitro* d'un produit chimique testé est déterminée par la catégorie du SGH de l'ONU qui correspond à la combinaison des catégories obtenues pour le gonflement cornéen, l'opacité cornéenne et la rétention de fluorescéine, ainsi que décrit au tableau 7.

Tableau 7. Classification générale des effets *in vitro*

Classification du SGH de l'ONU	Combinaison des 3 effets mesurés
Sans catégorie	3 x I 2 x I, 1 x II 2 x II, 1 x I
Aucune prédiction n'est possible	Autre combinaison
Catégorie 1	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II* 2 x IV, 1 x I* Opacité cornéenne = 3 à 30 min (dans au moins deux yeux) Opacité cornéenne = 4 en un point temporel quelconque (dans au moins deux yeux) Relâchement important de l'épithélium (dans au moins un œil)

Note : Combinaisons moins probables.

55. Si un examen histopathologique est réalisé pour des détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$), on applique les critères de décision énoncés au tableau 8. De plus, dans le cas où le score pour les noyaux pycnotiques du stroma est supérieur ou égal à « léger » (score 1) dans au moins 2 yeux sur 3, ou si des effets sont observés sur l'endothélium dans au moins 2 yeux sur 3, ces effets sont consignés en tant qu'observations, afin de fournir une indication de la gravité des effets.

Tableau 8. Critères de décision applicables à l'analyse histopathologique complémentaire de la méthode d'essai OPI standard validée pour la classification des détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) en catégorie 1 selon le SGH de l'ONU

Couche tissulaire	Effets associés à une classification pour lésions oculaires graves (Catégorie 1 du SGH de l'ONU)
Épithélium	<ul style="list-style-type: none"> - érosion = modérée (score 2) dans au moins 2 yeux sur 3 - et/ou, toute vacuolisation (= très légère, score ½) observée dans la couche intermédiaire et/ou basale dans au moins 2 yeux sur 3 - ou, SI érosion = modérée (score 2) dans 1 œil sur 3 ET vacuolisation = très légère (score ½) dans la couche intermédiaire et/ou basale observée dans au moins 1 œil sur 3 - et/ou nécrose = modérée (score 2) dans au moins 2 yeux sur 3

56. En outre, on utilise le modèle de prédiction tel qu'au tableau 9. Les critères d'analyse histopathologique des yeux de poulet isolés et le modèle de prédiction décrits aux tableaux 8 et 9, respectivement, s'appliquent uniquement pour classer les détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) en catégorie 1 du SGH de l'ONU.

Tableau 9. Modèle de prédiction pour l'identification des détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) à la suite d'une évaluation histopathologique des yeux de poulet isolés

Catégorie standard OPI	Critères d'analyse histopathologique des yeux de poulet isolés décrit au tableau 8	Classification du SGH de l'ONU
Aucune prédiction n'est possible	Critères remplis	Catégorie 1 du SGH de l'ONU
	Critères non remplis	Aucune prédiction n'est possible

Critères d'acceptation de l'étude

57. Un essai est considéré comme acceptable lorsque les témoins négatifs et de véhicule/solvant parallèles et les témoins positifs concurrents sont identifiés, respectivement, comme ne relevant pas de la classification du SGH et comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU.

Rapport d'essai

58. 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 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 ;
- le cas échéant, traitement du produit chimique testé ou témoin avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre) ;
- 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 commanditaire, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ; le cas échéant, nom du pathologiste ;
- identification de la source des yeux (par exemple, établissement auprès duquel ils ont été recueillis) ;

Conditions de la méthode d'essai

- description du système d'essai utilisé ;
- biomicroscope et pachymètre utilisés (modèle, par exemple) et réglages appliqués ;
- référence aux résultats témoins positifs et négatifs antérieurs et, le cas échéant, aux données antérieures démontrant les gammes de témoins de référence parallèles acceptables ;
- procédure utilisée pour garantir l'intégrité (c'est-à-dire la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (par exemple, essais périodiques de substances d'épreuve des compétences) ;
- Protocole de fixation des tissus si un examen histopathologique a été réalisé.

Collecte et préparation des yeux

- âge et poids de l'animal donneur et, dans la mesure du possible, d'autres caractéristiques spécifiques des animaux sur lesquels ont été prélevés les yeux (par exemple, sexe, souche) ;
- stockage et conditions de transport des yeux (par exemple, date et heure du prélèvement, délai entre la collecte des têtes de poulet et le placement des yeux énucléés dans la chambre de surfusion) ;

- préparation et montage des yeux y compris les notifications relatives à leur qualité, la température des chambres où sont placés les yeux, et les critères de sélection des yeux utilisés pour l'essai ;

Mode opératoire

- nombre de réplicats utilisés ;
- identité des témoins négatifs et positifs utilisés (le cas échéant, aussi des témoins de référence et du solvant) ;
- dose, application et temps d'exposition du produit chimique testé utilisé ;
- points temporels d'observation (avant et après traitement) ;
- description des critères d'évaluation et de décision utilisés y compris, le cas échéant, pour l'examen histopathologique ;
- système d'évaluation par les paires des observations histopathologiques, le cas échéant ;
- description des critères d'acceptation de l'étude utilisés ;
- description de toutes modifications apportées au mode opératoire.
- de plus, si elles ne font pas partie du mode opératoire de référence, par exemple, et si elles sont disponibles, les informations suivantes sont précisées :
 - description de la formation approfondie et de la transférabilité ;
 - fixateur, solvants de déshydratation et de clarification, et modes opératoires suivis ;
 - milieu d'inclusion, solvants d'infiltration et concentrations utilisées ;
 - épaisseur des coupes ;
 - colorant (dans le rapport) et mode opératoire de coloration ;
 - information sur les instruments utilisés ;

Résultats

- présentation sous forme de tableau des scores du gonflement cornéen, de l'opacité cornéenne et de la rétention de fluorescéine obtenus pour chaque œil et à chaque point temporel d'observation, y compris les scores moyens à chaque point d'observation pour tous les yeux testés ;
- description de tous les effets morphologiques observés ;
- les scores moyens les plus élevés du gonflement cornéen, de l'opacité cornéenne et de la rétention de fluorescéine observés (tout point temporel confondu), et leur catégorie OPI correspondante ;
- présentation sous forme de tableau des scores histopathologiques semi-quantitatifs et conclusions tirées, le cas échéant ;
- le cas échéant, indication des effets locaux observés lors de l'examen histopathologique ;
- description de tous les autres effets observés ;
- la classification du SGH *in vitro* retenue ;
- si nécessaire, photographies des yeux traités et des yeux témoins ;
- si nécessaire, images numériques facultatives ou images numériques des lames des échantillons histopathologiques ;

Discussion des résultats.

Conclusions.

Bibliographie

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse :
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible à l'adresse : [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible à l'adresse : [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>]
- (4) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Seventh revised edition, UN New York and Geneva, 2017. Disponible à l'adresse :
https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/English/03e_part3.pdf
- (5) OECD (2018). Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment No 188. ENV Publications, OECD, Paris
- (6) OECD (2018). Test Guideline 492. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. 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.
- (7) 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.
- (8) Adriaens E., Barroso J., Eskes C., Hoffmann S., McNamee P., Alépée N., Bessou-Touya S., De Smedt A, de Wever B., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Zuang V. (2014). Draize test for serious eye damage / eye irritation: importance of the endpoints evaluated with regard to UN GHS / EU CLP classification. Archives of Toxicology 88, 701-723.
- (9) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2014). Suitability of histopathology as an additional endpoint to the isolated chicken eye test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. Toxicology In Vitro 28, 657-666.
- (10) Reproducibility and predictive capacity of the Isolated Chicken Eye Test for the identification of non-extreme pH detergents and surfactants causing serious eye damage. Manuscript in preparation
- (11) 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.
- (12) OECD (2018) Guidance Document on “The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (13) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31, 69-76.
- (14) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Disponible à l'adresse : [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (15) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9, 871-929.
- (16) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34, 291-296.
- (17) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35, 23-37.
- (18) ICCVAM. OCDE (2006). Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à l'adresse : [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
- (19) Cazelle E., Eskes C., Hermann M., Jones P., McNamee P., Prinsen M., Taylor H., Wijnands M.V.W. (2015). Suitability of the Isolated Chicken Eye Test for Classification of Extreme pH Detergents and Cleaning Products. *Toxicology In Vitro* 29, 609-616.
- (20) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
- (21) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à l'adresse : [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- (22) 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.
- (23) Morton D., Sellers R.S., Barale-Thomas E., Bolon B., George C., Hardisty J.F., Irizarry A., McKay J.S., Odin M., Teranishi M. (2010). Recommendations for Pathology Peer Review. *Toxicol. Pathol.* 38, 1118-1127.

- (24) OECD (2014). Advisory document n. 16. Guidance on the good laboratory practice (GLP) Requirements for Peer Review of Histopathology. OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Advisory document of the working group on GLP. [ENV/JM/MONO\(2014\)30](#). Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeguidanceandcompliancemonitoring.htm>.
- (25) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471-480.
- (26) 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.

ANNEXE 1 : DÉFINITIONS

Précision : étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa « pertinence ». Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (25).

Produit chimique étalon : produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique testé. Un produit chimique étalon 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.

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).

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.

Opacité cornéenne : mesure de l'étendue de l'opacité de la cornée après exposition à un produit chimique testé. L'augmentation de l'opacité cornéenne est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Gonflement cornéen : mesure objective dans l'essai OPI de l'ampleur de la distension de la cornée après exposition à un produit chimique testé. Elle est exprimée en pourcentage et calculée au moyen des mesures initiales (avant administration de la dose) d'épaisseur cornéenne, et des mesures d'épaisseur relevées à intervalles réguliers après exposition au produit chimique testé dans l'essai OPI. Le degré de gonflement cornéen est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Détergents : mélanges (à l'exception des dilutions de tensioactifs purs) contenant un ou plusieurs tensioactifs(s) à une concentration finale supérieure à 3 %, destinés à des processus de lavage et de nettoyage. Les détergents peuvent être présentés sous n'importe quelle forme (liquide, poudre, pâte, barre, pain, pièce moulée, brique, etc.) et être commercialisés ou utilisés à des fins domestiques, institutionnelles ou industrielles.

Irritation oculaire : modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique testé sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec « Effets réversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 2 du SGH de l'ONU » (4).

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 des 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.

Rétention de fluorescéine : mesure subjective dans l'essai OPI de la quantité de fluorescéine sodique qui est retenue par les cellules épithéliales de la cornée après exposition à un produit chimique testé. Le degré de rétention de fluorescéine est un indicateur d'endommagement de la cornée.

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.

IATA : Approches Intégrées d'Essai et d'Évaluation.

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

Mélange : mélange ou solution composée de deux substances ou plus, qui ne réagissent pas entre elles (4).

Contrôle négatif : réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique testé et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

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 dans le SGH de l'ONU ».

Témoin positif : réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec un produit chimique connu pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, la gravité de la réaction ne doit pas être excessive.

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. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire.

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

Lésion oculaire grave : lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique testé sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec « Effets irréversibles sur l'œil » et avec « Catégorie 1 du SGH de l'ONU » (4).

Biomicroscope (lampe à fente) : instrument utilisé pour examiner directement l'œil sous le grossissement d'un microscope binoculaire en créant une image stéréoscopique droite. Dans la méthode d'essai OPI, cet instrument est utilisé pour visualiser les structures antérieures de l'œil de poulet et également pour mesurer objectivement l'épaisseur de la cornée au moyen d'un dispositif adjoint de mesure de la profondeur.

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.

Substance : un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition (4).

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.

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).

Produit chimique testé : produit chimique (substance ou mélange) évalué avec la méthode d'essai.

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 afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, 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.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques) : 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 l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (4).

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 ».

Sans catégorie dans le SGH de l'ONU : produits chimiques testés qui ne répondent pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU. Interchangeable avec « Non classé ».

Méthode d'essai validée : méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

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.

ANNEXE 2 : SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI OPI

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 déterminant correctement la catégorie de danger pour l'œil des 13 produits chimiques recommandés dans le tableau 10. Les résultats OPI fournis sont des exemples de la gamme de réactions observées pendant les études d'évaluation et pouvant être attendues (5) (18). Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions selon le danger qu'elles représentent pour l'œil, sur la base des résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (LD 405) et du SGH de l'ONU (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou « sans catégorie ») (4) (26). Les autres critères de sélection pour ces produits sont que, dans la mesure du possible, ils produisent des résultats reproductibles avec la méthode OPI, ils sont disponibles sur le marché et ils sont associés à des données de référence *in vivo* de bonne qualité. Les données de référence sont disponibles dans le Récapitulatif simplifié (5). Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou lorsque sa non-utilisation est justifiable, un autre produit chimique remplissant les conditions énoncées ci-avant peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés dans l'évaluation et la validation de la méthode d'essai OPI (5) (18). Ces changements doivent cependant être justifiés.

Tableau 10. Produits chimiques recommandés pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode OPI

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique ¹	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> selon le SGH de l'ONU ²	Classification OPI selon le SGH de l'ONU ^{3,4}
Chlorure de benzalkonium (10 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Hydroxyde de sodium (10 %)	1310-73-2	Alcali	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Imidazole	288-32-4	Hétérocyclique	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide trichloracétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction n'est possible ⁴
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sels inorganiques	Solide	Catégorie 2A ⁵	Aucune prédiction n'est possible ⁴
Hydroxyde de sodium (1 %)	1310-73-2	Alcali	Liquide	Catégorie 2B	Aucune prédiction n'est possible ⁴
Diméthylsulfoxyde	67-68-5	Composé organo-sulfuré	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
Triméthylacét	3938-95-2	Ester	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie

ate d'éthyle					
Méthylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbure (cyclique)	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbure (acyclique)	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
Triacétine	102-76-1	Lipide	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie

Abréviations : N°CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service ; OPI : essai sur œil de poulet isolé ; n.d. : non disponible ; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (4).

¹Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque produit à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

²D'après les résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE n 405) et en utilisant le SGH (ONU) (4)(26).

³D'après les résultats obtenus avec la méthode OPI comme décrit au tableau 7.

⁴ Combinaison des scores OPI autres que ceux décrits au tableau 6 pour l'identification des produits ne relevant d'aucune catégorie du SGH ou relevant de la catégorie 1 du SGH (tableau 7)

⁵ La classification dans les catégorie 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 animal sur 3 ou 2 animaux sur 3 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* a été menée sur 3 animaux. Tous les effets sauf une rougeur conjonctivale chez un animal avaient disparu le septième jour ou avant. Le seul animal chez lequel la rougeur n'avait pas disparu le septième jour (score de 1) était pleinement rétabli le dixième jour.

**ANNEXE 3 : SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR
L'EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE SUR OPI À UTILISER EN
SUPPLÉMENT DE LA MÉTHODE D'ESSAI OPI STANDARD DANS LE
CAS DU DOMAINE D'APPLICATION LIMITÉ DES DÉTERGENTS ET
TENSIOACTIFS À PH NON EXTRÊME ($2 < \text{pH} < 11.5$)**

Avant d'utiliser en routine une méthode d'histopathologie sur OPI en supplément de la méthode d'essai OPI standard dans le cas du domaine d'application limité des détergents et tensioactifs à pH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$), les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de danger pour l'œil des 6 produits chimiques recommandés dans le tableau 11. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions selon le danger qu'ils représentent pour l'œil, sur la base des résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (LD 405) et du SGH de l'ONU (c'est-à-dire les catégories 1, 2, ou « sans catégorie ») (4) (26). Les autres critères de sélection des produits chimiques sont que, dans la mesure du possible, ils produisent des résultats reproductibles avec la méthode d'histopathologie sur OPI, ils sont disponibles sur le marché et ils sont associés à des données de référence *in vivo* de bonne qualité. Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou lorsque sa non-utilisation est justifiable, un autre produit chimique remplissant les conditions énoncées ci-avant peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés pour l'examen histopathologique sur œil de poulet isolé (10). Ces changements doivent cependant être justifiés.

Abréviations : N° CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service

Tableau 11. Produits chimiques recommandés pour démontrer la compétence technique des laboratoires au regard de l'examen histopathologique sur OPI

Produit chimique	N° CAS	Type de tensioactif	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> ¹	Classification après OPI normale selon le SGH de l'ONU ²	Classification de l'histopathologie sur OPI selon le SGH de l'ONU ²
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Cationique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1	Catégorie 1 (érosion) dans 3 laboratoires sur 3
Chlorure de benzènesulfonyle	98-09-9	Anionique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1	Catégorie 1 (nécrose et vacuolisation) dans 3 laboratoires sur 3
Chlorure de cétylpyridinium (10 %)	140-72-7	Cationique	Liquide	Catégorie 1	Aucune prédiction n'est possible	Catégorie 1 (vacuolisation) dans 3 laboratoires sur 3
Chlorure de cétylpyridinium (1 %)	140-72-7	Cationique	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction n'est possible	Aucune prédiction n'est possible dans 3 laboratoires sur 3
N-Lauroylsarcosinate de sodium (10 %)	137-16-6	Anionique	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction n'est possible	Aucune prédiction n'est possible dans 3 laboratoires sur 3
Chlorure de cétylpyridinium (0.1 %)	140-72-7	Cationique	Liquide	Sans catégorie	Aucune prédiction n'est possible	Aucune prédiction n'est possible dans 3 laboratoires sur 3

Abréviations : N° CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service

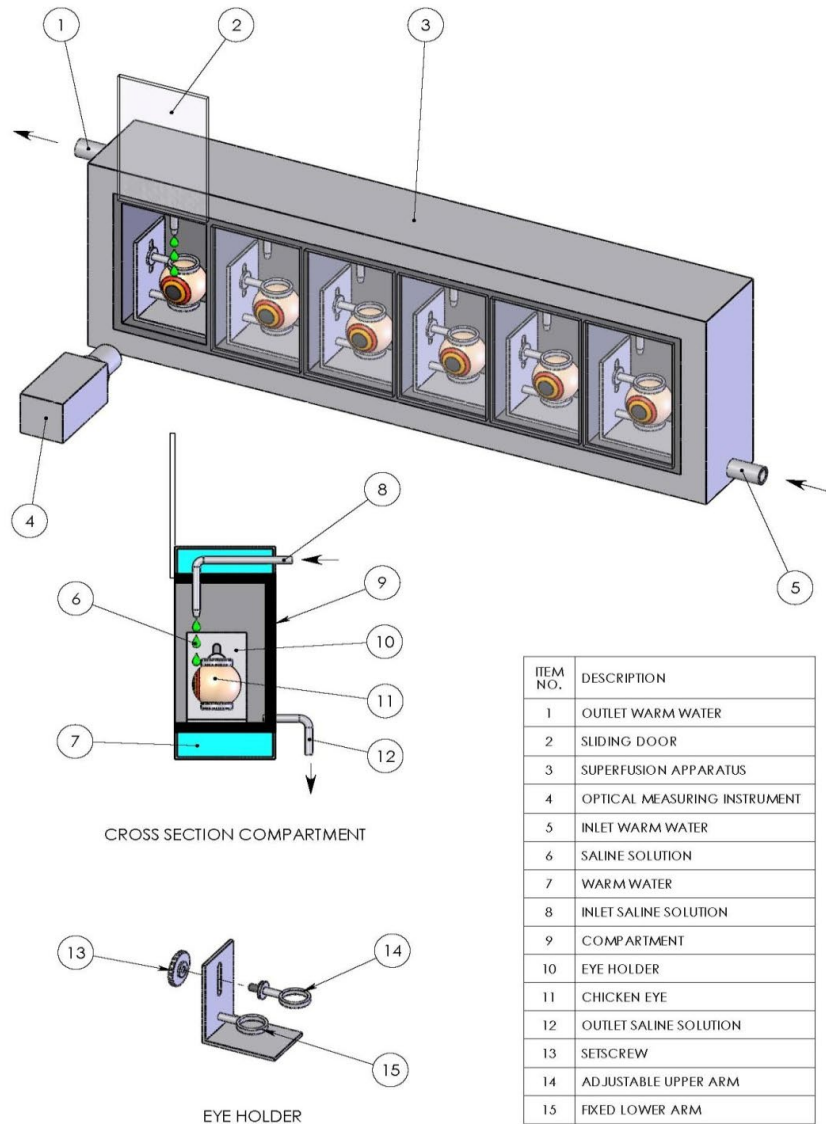
1 D'après les résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE n° 405) et en utilisant le SGH (ONU) (4)(26).

2 D'après les résultats obtenus avec la méthode OPI comme décrit au tableau 7.

3 D'après les critères pour l'examen histopathologique sur OPI décrits aux tableaux 8 et 9 et dans le document d'orientation 160 de l'OCDE mis à jour (12).

ANNEXE 4

Figure 1. SCHÉMA D'UN APPAREIL DE SURFUSION ET DES CLAMPS POUR ŒIL (MÉTHODE OPI)



Note : (Voir (25) pour d'autres descriptions génériques sur l'appareil de superfusion et des clamps pour œil)

Traduction :

Vue en coupe du compartiment / support d'œil

Élément / Description

- 1 / sortie d'eau chaude, 2 / porte coulissante, 3 / appareil de superfusion, 4 / instrument de mesure optique,
- 5 / entrée d'eau chaude, 6 / solution saline, 7 / eau chaude, 8 / entrée de solution saline,
- 9 / compartiment, 10 / support d'œil, 11 / œil de poulet, 12 / sortie de solution saline, 13 / vis de blocage,
- 14 / bras supérieur ajustable, 15 / bras inférieur fixe