



**Section 4**  
**Effets sur la santé**

**Ligne directrice n° 437**  
Méthode d'essai d'opacité et de  
perméabilité de la cornée bovine pour  
l'identification des produits chimiques  
i) provoquant des lésions oculaires  
graves ou ii) ne relevant d'aucune  
classification pour irritation  
oculaire ou lésion oculaire

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 d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

#### INTRODUCTION

1. La méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (OPCB) OP-KIT 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). La première évaluation visait à déterminer l'utilité de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (1). La seconde évaluation a consisté à déterminer l'utilité de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) non classés comme irritants pour l'œil ou provoquant de graves lésions oculaires (2). La base de données de validation OPCB contient au total 113 substances et 100 mélanges (2)(3). À l'issue de ces évaluations et de leur examen par les pairs, il a été conclu que cette méthode d'essai OPCB OP-KIT peut identifier correctement les produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (4), et son utilité scientifique a donc été validée dans les deux cas. Une lésion oculaire grave est une lésion des tissus oculaires ou une 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. Les produits chimiques testés provoquant des lésions oculaires graves sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU. Les produits chimiques non classés comme irritants pour les yeux ou provoquant de graves lésions oculaires sont définis comme ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU, autrement dit, ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU. La présente Ligne directrice (adoptée en 2009 et mise à jour en 2013) indique les applications recommandées et les limites de la méthode OPCB au regard de ces évaluations. Les principales différences entre la version originale de 2009 et la mise à jour de 2013 concernent notamment : l'application de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification au titre du SGH de l'ONU (paragraphe 2 et 7 de la version originale) ; des éclaircissements sur l'applicabilité de la méthode OPCB pour tester les alcools, les cétones et les solides (paragraphe 6 et 7) ainsi que les substances et les mélanges (paragraphe 8) ; des éclaircissements sur

la façon de tester les substances tensioactives et les mélanges contenant des tensioactifs (paragraphe 28) ; des mises à jour et des éclaircissements relatifs aux témoins positifs (paragraphe 39 et 40) ; une mise à jour des critères de décision concernant la méthode OPCB (paragraphe 47) ; une mise à jour des critères d'acceptation de l'étude (paragraphe 48) ; une mise à jour concernant les éléments du rapport d'essai (paragraphe 49) ; une mise à jour de l'annexe 1 sur les définitions ; l'ajout de l'annexe 2 pour la valeur prédictive de la méthode d'essai OPCB dans différents système de classification ; une mise à jour de l'annexe 3 sur la liste des substances d'épreuve ; et une mise à jour de l'annexe 4 sur le porte-cornée pour la méthode OPCB (paragraphe 1) et sur l'opacitomètre (paragraphe 2 et 3). En 2020, la Ligne directrice a de nouveau été mise à jour pour permettre l'utilisation d'un opacitomètre basé sur la lumière laser (LLBO) qui a montré des performances similaires à l'opacitomètre OP-KIT utilisé lors de la validation de la méthode OPCB (voir paragraphes 6, 7, 42, 45, 48 annexes 2 et 5). L'annexe 3 décrivant la liste des substances d'épreuve a également été mise à jour en 2020.

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 Ligne directrice 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) pourrait remplacer le test oculaire de Draize (6). L'approche « top-down » (6) 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 » (6) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification. La méthode OPCB est une méthode d'essai in vitro pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières, 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 OPCB est recommandée comme première étape d'une stratégie d'essai telle que l'approche « top-down » suggérée par Scott et al. (6) 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 OPCB 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) dans le cadre d'une stratégie d'essai telle que l'approche « bottom-up » (5). Cependant, un produit chimique qui, avec la méthode OPCB, semble ne causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification pour irritation oculaire/lésion oculaire grave nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires (in vitro et/ou in vivo) pour établir une classification définitive. Le choix de la méthode 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).

3. L'objet 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 provoquer une opacité et une perméabilité accrue sur une cornée bovine isolée. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par : (i) la diminution de la capacité de transmission de la lumière (opacité) ; et (ii) l'augmentation du passage de la fluorescéine sodique (perméabilité). Les mesures de l'opacité et de la perméabilité de la cornée suite à son exposition au produit chimique testé sont ensuite combinées pour établir le score d'irritation in vitro (SIIV) ou le score d'irritation LLBO (SIL), utilisé pour classer le produit chimique testé en fonction de son pouvoir irritant.

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

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. Cette Ligne directrice est fondée sur le protocole expérimental de la méthode OPCB de l'ICCVAM (8)(9), élaboré à l'origine à partir des informations provenant du protocole de l'Institute for In Vitro Sciences (IIVS) et sur le protocole INVITTOX n° 124 (10). Ce dernier protocole a été utilisé lors de l'étude de pré-validation conduite en 1997-1998 sous l'égide de la Communauté européenne. Ces protocoles étaient tous deux fondés sur la méthode d'essai OPCB décrite pour la première fois par Gautheron et al. (11).

6. Les méthodes OPCB OP-KIT et LLBO peut être utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, selon la définition du SGH de l'ONU, à savoir les produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce cadre, la méthode d'essai OPCB OP-KIT présente une précision globale de 79 % (150/191), un taux de faux positifs de 25 % (n=126) et un taux de faux négatifs de 14 % (n=65), en comparaison avec les données de la méthode d'essai sur œil de lapin *in vivo*, classés selon le système de classification du SGH de l'ONU (3) (voir annexe 2, tableau 1). Si l'on exclut de la base de données les produits chimiques testés relevant de certaines classes chimiques (alcools, cétones) ou physiques (matières solides), la précision de la méthode OPCB OP-KIT au regard du système de classification du SGH de l'ONU est de 85 % (n=131), le taux de faux positifs de 20 % (n=81), et le taux de faux négatifs de 8 % (n=50). La méthode OPCB LLBO a une précision globale de 78% (n=145), un taux de faux positifs de 21% (n=89), un taux de faux négatifs de 24% (n=56), en comparaison avec les données de la méthode d'essai sur œil de lapin *in vivo*, classés selon le système de classification du SGH de l'ONU (12) (voir [annexe 2](#), tableau 3). Si l'on exclut de la base de données les produits chimiques testés relevant de certaines classes chimiques (alcools, cétones) ou physiques (matières solides), la précision de la méthode OPCB LLBO au regard du système de classification du SGH de l'ONU est de 85 % (n=55), le taux de faux positifs de 17 % (n=32), et le taux de faux négatifs de 13 % (n=23). Par ailleurs, les produits chimiques qui induisent des effets sévères non persistants *in vivo* peuvent donner des résultats sous-prédictifs de leur vrai danger oculaire quand ils sont testés par la méthode OPCB (13). Les limites potentielles de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) concernent le taux élevé de faux positifs pour les alcools et les cétones, et le taux élevé de faux négatifs pour les substances solides, relevés dans la base de données de validation (1)(2)(3). Toutefois, tous les alcools et cétones n'étant pas surévalués par la méthode OPCB et certains étant correctement identifiés comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, on ne considère pas que ces deux groupes fonctionnels organiques sortent du champ d'application de la méthode d'essai. Il appartient à l'utilisateur appliquant cette Ligne directrice de décider si une surévaluation possible d'un alcool ou cétone est acceptable ou s'il est nécessaire de réaliser des tests complémentaires fondés sur une analyse du poids de la preuve. Concernant les taux de faux négatifs pour les solides, il convient de relever que les solides peuvent entraîner des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation oculaire *in vivo* de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (14). Il convient également de noter qu'aucun des faux négatifs identifiés dans la base de données de validation de l'ICCVAM (2)(3) ou dans l'étude d'évaluation LLBO (12), lors de l'identification de produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), n'a été prédit comme ne relevant d'aucun catégorie du SGH de l'ONU. De plus, les faux négatifs obtenus avec la méthode OPCB dans ce contexte ne sont pas préoccupants car tous les produits chimiques testés pour lesquels une prédiction de classification définitive ne peut être établie selon le SGH de l'ONU feront ensuite l'objet d'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. Certains produits chimiques solides étant correctement identifiés avec la méthode OPCB comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, on ne considère pas non plus que cet état physique sorte du champ d'application de la méthode d'essai. Les utilisateurs peuvent utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques pour lesquels un effet provoquant des lésions oculaires graves et une prédiction de classement du produit chimique testé dans

la catégorie 1 du SGH de l'ONU peuvent être utilisés pour classer le produit chimique testé dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire. Comme mentionné précédemment, il convient toutefois d'interpréter avec prudence les résultats positifs obtenus avec des alcools ou des cétones en raison du risque de surestimation.

7. La méthode OPCB 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). Appliquée dans ce cadre, la méthode d'essai OPCB OP-KIT présente une précision d'ensemble de 69 % (n=196), un taux de faux positifs de 69 % (n=89) et un taux de faux négatifs de 0 % (n=107), 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 (3) (voir annexe II, tableau 2). La méthode OPCB LLBO a une précision globale de 83% (n=145), un taux de faux positifs de 45% (n=41), un taux de faux négatifs de 6% (n=104), en comparaison avec les données de la méthode d'essai sur œil de lapin in vivo, classés selon le système de classification du SGH de l'ONU (12) (voir annexe 2, Tableau 4). Le taux de faux positifs obtenu (produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU in vivo, voir paragraphe 48) est considérablement élevé, mais pas préoccupant dans ce contexte car tous les produits chimiques testés pour lesquels une prédiction de classification définitive ne peut être établie selon le SGH de l'ONU feront ensuite l'objet d'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. La méthode OPCB ne montre aucune limite spécifique pour tester les alcools, les cétones et les solides quand l'objectif est d'identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« sans catégorie » du SGH de l'ONU) (3)(12). Les utilisateurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'accepter qu'un résultat négatif (c'est-à-dire ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU) indique qu'aucune classification n'est requise (« sans catégorie » du SGH de l'ONU). Les méthodes OPCB OP-KIT et LLBO ne parvenant respectivement à identifier correctement que 31 % et 55% des produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, cette méthode d'essai ne doit pas être privilégiée pour lancer une approche « bottom-up » (6), si d'autres méthodes in vitro validées et acceptées avec une sensibilité élevée similaire mais une spécificité supérieure sont possibles.

8. La base de données de validation de la méthode OPCB utilisant l'appareil OP-KIT pour la mesure de l'opacité contient au total 113 substances et 100 mélanges (2)(3). La méthode OPCB utilisant l'appareil LLBO pour la mesure de l'opacité contient 145 substances (12). A ce jour, aucun mélange n'a fait l'objet de tests par l'appareil LLBO, néanmoins les deux appareils semblent donc pouvoir s'appliquer aux essais des substances et des mélanges.

9. La méthode OPCB 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 (2)(3). Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée. La méthode d'essai OPCB est considérée comme sous-prédictive du danger oculaire grave qui mène au classement en catégorie 1 de SGH de l'ONU pour les produits phytosanitaires (15).

10. Les provenances d'yeux et de cornées incluent, mais ne se limitent pas aux abattoirs, les fournisseurs commerciaux, et les instituts de recherches. Les fournisseurs doivent se conformer à toutes les lois, directives, réglementations, instructions applicables et les permis nécessaires. Quant au laboratoire, tous les modes opératoires sur l'œil de bovin doivent respecter les réglementations applicables

aux installations d'essai et les protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. L'usage des précautions universelles de laboratoire est recommandé (16).

11. Bien que la méthode OPCB ne prenne pas en considération les lésions conjonctivales et iridiennes, elle prend en compte les lésions cornéennes, qui sont le facteur principal dans la classification selon les effets *in vivo*, dans le cadre d'application du SGH de l'ONU. La réversibilité des lésions cornéennes ne peut pas, par définition, être évaluée avec la méthode OPCB. Il a été proposé, sur la base d'études menées sur l'œil de lapin, qu'une évaluation de la profondeur initiale de la lésion cornéenne puisse être utilisée pour distinguer les effets réversibles des effets irréversibles (17). Cependant, des connaissances scientifiques approfondies seront nécessaires pour comprendre comment les effets irréversibles qui ne sont pas liés à une lésion initiale importante peuvent survenir. Enfin, la méthode OPCB ne permet pas d'évaluer la toxicité systémique potentielle associée à l'exposition oculaire.

12. La présente ligne directrice sera mise à jour régulièrement, à mesure que de nouvelles informations et données seront examinées. Ainsi, l'histopathologie peut s'avérer utile lorsqu'une caractérisation plus complète de la lésion cornéenne est nécessaire. Comme indiqué dans le Document d'orientation no. 160 (18), les utilisateurs sont encouragés à conserver les cornées et à préparer des spécimens histopathologiques en vue d'établir une base de données et de définir des critères de décision susceptibles d'améliorer la précision de cette méthode d'essai.

13. Pour tout laboratoire mettant en œuvre la méthode d'essai pour la première fois, la liste des substances d'épreuve de compétence est fournie à l'annexe 3. Un laboratoire peut utiliser ces produits chimiques afin de démontrer sa compétence technique dans la conduite de l'essai OPCB avant de soumettre des données résultant de l'application de la méthode OPCB à des fins réglementaires de classification des dangers.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La méthode d'essai OPCB est un modèle organotypique qui permet de maintenir *in vitro* les fonctions physiologiques et biochimiques normales de la cornée bovine pendant une courte période. Selon cette méthode, les dommages causés par le produit chimique testé sont évalués par des mesures quantitatives des modifications de l'opacité et de la perméabilité de la cornée réalisées, respectivement, à l'aide d'un opacitomètre et d'un spectrophotomètre visible. Ces deux mesures entrent dans le calcul de l'IVIS ou SIL, valeur utilisée pour assigner une catégorie de classification de danger d'irritation *in vitro* permettant d'estimer le potentiel d'irritation oculaire *in vivo* d'un produit chimique testé (voir « Critères de décision » au paragraphe 48).

15. La méthode d'essai OPCB utilise des cornées isolées provenant d'yeux de bovins (bœuf ou veau) récemment abattus. L'opacité cornéenne est mesurée par la quantité de lumière traversant la cornée. La perméabilité est mesurée par la quantité de fluorescéine sodique traversant toute l'épaisseur de la cornée, et détectée dans le milieu de la chambre postérieure. Les produits chimiques testés sont appliqués sur la surface épithéliale de la cornée en étant ajoutés dans la chambre antérieure du porte-cornée. L'annexe 4 présente une description et un schéma de porte-cornée utilisé dans la méthode OPCB. Ces appareils sont disponibles dans le commerce auprès de différents fabricants, ou peuvent être construits.

### ***Provenance et âge des yeux de bovins et sélection des espèces animales***

16. Les bovins envoyés à l'abattoir sont généralement destinés à la consommation humaine ou à d'autres usages commerciaux. Seules les cornées de bêtes en bonne santé, considérées comme propres à intégrer la chaîne alimentaire humaine, sont prélevées pour la méthode OPCB. Le poids des bovins

variant considérablement en fonction de la race, de l'âge et du sexe, il n'existe aucune recommandation spécifique en la matière au moment de l'abattage.

17. L'utilisation d'yeux provenant d'animaux d'âges différents peut entraîner des variations de dimension des cornées. Les cornées dont le diamètre horizontal est supérieur à 30.5 mm et l'épaisseur cornéenne centrale (ECC) supérieure ou égale à 1 100 µm ont généralement été prélevées sur des bovins de plus de huit ans, tandis que les cornées ayant un diamètre horizontal inférieur à 28.5 mm et une ECC inférieure à 900 µm proviennent plutôt de bêtes de moins de cinq ans (19). En conséquence, les yeux des bovins âgés de plus de 60 mois ne sont généralement pas utilisés. En général, les yeux des bovins de moins de 12 mois ne sont pas non plus utilisés, car leur développement n'est pas terminé et l'épaisseur ainsi que le diamètre cornéen sont nettement inférieurs à ceux des yeux provenant de bovins adultes. Toutefois, les cornées issues d'animaux jeunes (entre 6 et 12 mois) sont acceptables car elles présentent certains avantages, tels qu'une plus grande disponibilité, une fourchette d'âge plus restreinte, et des risques moins importants d'exposition potentielle à l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (20) ; la réglementation en vigueur doivent être appliquée pour le personnel potentiellement exposé à l'ESB. Une évaluation plus poussée des effets de la taille ou de l'épaisseur cornéenne sur la sensibilité aux substances corrosives et irritantes serait d'une grande utilité, aussi les utilisateurs sont-ils encouragés à consigner l'âge et/ou le poids estimés des animaux ayant fourni les cornées utilisées dans l'étude.

### ***Collecte et transport des yeux jusqu'au laboratoire***

18. Les yeux sont prélevés par les employés formés des abattoirs, des fournisseurs commerciaux et des instituts de recherche. Afin de minimiser tout endommagement, mécanique ou autre, des yeux, ceux-ci doivent être énucléés dès que possible après la mort de l'animal et immédiatement refroidies après énucléation et pendant le transport. Pour éviter d'exposer les yeux à des substances potentiellement irritantes, les employés de l'abattoir ne doivent pas utiliser de détergent lors du rinçage de la tête de l'animal.

19. Les yeux doivent être immédiatement et totalement immergés dans une solution froide saline équilibrée de Hank (HBSS), dans un récipient de taille adaptée, et transportés jusqu'au laboratoire en ayant soin de minimiser tout endommagement et/ou contamination bactérienne. Les yeux étant prélevés au cours de l'abattage, ils risquent d'entrer en contact avec du sang ou d'autres substances biologiques, notamment des bactéries ou autres microorganismes. Il importe donc de réduire au minimum le risque de contamination (par exemple en plaçant le récipient contenant les yeux sur de la glace mouillée, pendant la collecte et le transport, ou en ajoutant des antibiotiques à la HBSS utilisée pour le transport [100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, par exemple]).

20. Il faut limiter au maximum l'intervalle de temps entre le prélèvement des yeux et l'utilisation des cornées dans le cadre de l'essai OPCB (l'utilisation doit avoir lieu le jour même du prélèvement) et démontrer qu'il ne compromet pas les résultats de l'essai. Ces résultats se fondent sur les critères de sélection des yeux, ainsi que sur les réponses des témoins positifs et négatifs. Tous les yeux utilisés au cours de l'essai doivent provenir d'un lot d'yeux collectés le même jour.

### ***Critères de sélection des yeux utilisés pour la méthode OPCB***

21. Une fois parvenus au laboratoire, les yeux sont examinés avec soin pour déceler d'éventuels défauts, tels qu'une opacité avancée, des éraflures ou une néovascularisation. Seules les cornées d'yeux exempts de tout défaut seront utilisées.

22. La qualité de chaque cornée est également évaluée à des stades ultérieurs de l'essai. Pour l'appareil OP-KIT, les cornées non-traitées présentant une opacité supérieure à sept unités d'opacité ou

l'équivalent après une période initiale d'équilibration d'une heure ( $t_0$ ) doivent être écartées. Concernant l'appareil LLBO, les cornées non traitées au temps  $t_0$  présentant une mesure laser inférieure à 1200 lux ou supérieure à 1850 lux doivent être écartées (NB : l'opacitomètre doit être étalonné en fonction des normes d'opacité utilisées pour définir les unités d'opacité, voir annexe 5).

23. Chaque groupe de traitement (produit chimique testé et témoins négatifs et positifs) est composé de trois yeux au minimum. L'essai OPCB nécessite trois cornées servant de témoins négatifs. Toutes les cornées étant prélevées sur le globe oculaire entier puis placées dans les chambres du porte-cornée, les manipulations peuvent entraîner d'éventuels artefacts sur les valeurs de l'opacité et de la perméabilité cornéennes de chaque élément (y compris le témoin négatif). Par ailleurs, les valeurs d'opacité et de perméabilité mesurées sur les cornées témoins négatives servent à corriger les valeurs d'opacité et de perméabilité cornéennes des spécimens et des témoins traités positifs lors du calcul du score d'irritation *in vitro*.

## MODE OPÉRATOIRE

### *Préparation des yeux*

24. Des cornées exemptes de tout défaut sont découpées en conservant un rebord de 2 à 3 mm de sclère destiné à faciliter les manipulations ultérieures, et en prenant soin de ne pas endommager l'épithélium et l'endothélium cornéens. Les cornées isolées sont placées dans des porte-cornées spécialement conçus à cet effet, qui se composent de deux compartiments, antérieur et postérieur, respectivement en contact avec les faces épithéliale et endothéliale de la cornée (annexe 4). Il convient de remplir jusqu'à débordement ces deux chambres d'un milieu essentiel minimum de Eagle (MEME) préalablement chauffé et ne contenant pas de phénol rouge (en commençant par la chambre postérieure), en évitant toute formation de bulles d'air. L'appareil est ensuite équilibré à une température de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant une heure au moins ( $t_0$ ), afin que les cornées s'équilibrent avec le milieu et atteignent une activité métabolique aussi proche de la normale que possible (la température de la surface cornéenne *in vivo* est d'environ  $32^\circ\text{C}$ ).

25. Après la période d'équilibration, un nouveau MEME préalablement chauffé et ne contenant pas de phénol rouge est ajouté dans les deux chambres, et une première mesure d'opacité est effectuée pour chaque cornée. Les cornées présentant une altération macroscopique des tissus (éraflures, pigmentation ou néovascularisation, par exemple) ou pour les opacitomètres : une opacité supérieure à 7 unités d'opacité pour l'appareil OP-KIT ou pour l'appareil LLBO une mesure laser inférieure à 1200 lux ou supérieure à 1850 lux, sont écartées. Au moins trois cornées sont sélectionnées pour servir de témoins négatifs (ou témoins de solvant). Les cornées restantes sont ensuite réparties entre le groupe de traitement et celui des témoins positifs.

26. La capacité calorifique de l'eau étant supérieure à celle de l'air, l'eau procure des conditions de température plus stables pour l'incubation. Aussi est-il recommandé de plonger le porte-cornée dans un bain d'eau pour maintenir son contenu à  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Toutefois, il est également possible d'utiliser des incubateurs à air, à condition d'assurer la stabilité de la température (en chauffant au préalable les porte-cornées et les milieux, par exemple).

### *Application du produit chimique testé*

27. Deux protocoles d'application différents sont utilisés, l'un pour les liquides et les tensioactifs (solides ou liquides), et l'autre pour les solides non tensioactifs.



28. Les liquides sont testés non dilués. Les semi-solides, les crèmes et les cires sont typiquement testés comme les liquides. Les tensioactifs sont testés à une concentration de 10 % en masse volumique dans une solution de chlorure de sodium 0.9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Il conviendra de justifier de façon idoine l'utilisation de tout autre taux de concentration. Les mélanges contenant des tensioactifs peuvent être testés sans être dilués ou dilués à une concentration adéquate en fonction de la situation d'exposition pour les humains. Il conviendra de justifier de façon idoine la concentration utilisée. Les cornées sont ensuite exposées aux liquides ou tensioactifs pendant 10 minutes. L'utilisation d'une autre durée d'exposition devra être scientifiquement justifiée. Il convient de se rapporter à l'annexe 1 pour la définition d'un tensioactif et d'un mélange contenant des tensioactifs.

29. Les solides non tensioactifs sont généralement testés sous forme de solutions ou de suspensions à une concentration poids/volume de 20 % dans une solution de chlorure de sodium 0.9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Dans certaines circonstances et uniquement si cela est justifié scientifiquement, les solides peuvent aussi être testés purs par application directe sur la surface cornéenne, selon la méthode en chambre ouverte (voir paragraphe 32). Les cornées sont exposées aux solides pendant quatre heures, mais comme pour les liquides et les tensioactifs, des durées d'exposition différentes sont possibles moyennant une justification scientifique appropriée.

30. Différentes méthodes d'application peuvent être utilisées, en fonction de la nature physique et des caractéristiques chimiques des produits chimiques testés (solides, liquides, liquides visqueux ou non visqueux, par exemple). Il est très important que le produit chimique testé recouvre convenablement la surface épithéliale puis soit correctement retirée durant les étapes de rinçage. Il conviendra généralement d'utiliser la méthode en chambre fermée pour les produits chimiques testés liquides non visqueux ou légèrement visqueux, tandis que la méthode en chambre ouverte sera privilégiée pour les produits chimiques testés semi-visqueux et visqueux et pour les solides purs.

31. Dans la méthode en chambre fermée, une quantité de produit chimique testé suffisante pour recouvrir la face épithéliale de la cornée (750 µl) est introduite dans la chambre antérieure par les trous de dosage situés sur la face supérieure de celle-ci. Les trous sont ensuite occultés à l'aide de capuchons durant la durée d'exposition. Il importe de s'assurer que chaque cornée est exposée à un produit chimique testé pendant la durée qui convient.

32. Dans la méthode en chambre ouverte, la goupille de fermeture et la fenêtre en verre de la chambre antérieure sont retirés avant l'application. Le produit chimique testé ou témoin (750 µl, ou une quantité suffisante pour recouvrir entièrement la cornée) est directement appliqué sur la surface épithéliale cornéenne à l'aide d'une micropipette. Si le produit chimique testé est difficile à pipeter, il est possible d'utiliser une pipette à déplacement positif qui permet un dosage plus précis. L'embout de la pipette à déplacement positif est inséré dans l'embout distributeur de la seringue de manière à ce que le produit chimique testé puisse être chargé dans la pipette sous pression. Il convient ensuite de pousser le piston de la seringue tout en tirant simultanément celui de la pipette. Si des bulles d'air se forment dans l'embout de la pipette, il faut alors retirer le produit chimique testé (en l'expulsant) et répéter le processus jusqu'à ce qu'aucune bulle d'air n'apparaisse au moment du remplissage de la pipette. Il est possible d'utiliser si nécessaire une seringue normale (sans aiguille), ce qui permet de mesurer un volume précis de produit chimique testé et de l'appliquer plus facilement sur la surface épithéliale de la cornée. Après le dosage, la fenêtre en verre est replacée sur l'ouverture de la chambre antérieure afin de recréer un système fermé.

***Incubation post-exposition***

33. Après la période d'exposition, le produit chimique testé, ou la substance témoin négative ou positive, est retiré de la chambre antérieure et l'épithélium est rincé au moins trois fois (ou jusqu'à ce qu'aucune trace du produit chimique testé ne soit plus visible) au moyen d'un MEME contenant du rouge de phénol. Le rinçage est effectué à l'aide d'un milieu contenant du rouge de phénol, dont le changement de couleur permet de déterminer l'efficacité du rinçage des substances acides ou alcalines. Il convient de laver à nouveau les cornées si, après trois rinçages, le rouge de phénol est encore altéré (jaune ou violet) ou si le produit chimique testé est toujours visible. Une fois le milieu débarrassé du produit chimique testé, les cornées subissent un dernier rinçage avec un MEME sans rouge de phénol, ce qui permet de s'assurer que la chambre antérieure est débarrassée de tout rouge de phénol avant la mesure d'opacité. La chambre antérieure est ensuite à nouveau remplie d'un MEME neuf sans rouge de phénol.

34. Pour les liquides et les tensioactifs, les cornées sont incubées après rinçage pendant deux heures supplémentaires à  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Il peut être utile, dans certaines circonstances (déterminées au cas par cas), de prévoir une durée d'incubation post-exposition plus longue. Les cornées sur lesquelles des solides ont été appliqués sont soigneusement rincées après une période d'exposition de quatre heures, et ne requièrent pas d'incubation supplémentaire.

35. Au terme de la période d'incubation post-exposition pour les liquides et les tensioactifs, et au terme de la période d'exposition de quatre heures pour les solides non tensioactifs, le degré d'opacité et de perméabilité de chaque cornée est enregistré. En outre, chaque cornée est observée visuellement et des commentaires pertinents sont consignés (exfoliation des tissus, résidus de produit chimique testé ou opacité non uniforme, par exemple). Ces observations peuvent s'avérer importantes car elles peuvent être reflétées par des variations de lecture de l'opacimètre.

***Substances témoin***

36. Des témoins négatifs ou des témoins de solvant/véhicule ainsi que des témoins positifs doivent être inclus en parallèle dans chaque expérience.

37. Lorsqu'une substance liquide non diluée est soumise à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB une substance témoin négatif concurrente (solution de chlorure de sodium 0.9 % ou eau distillée, par exemple) afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'évaluation de l'essai. Cette méthode permet également de garantir que les conditions de l'essai n'entraînent aucune réaction d'irritation indésirable.

38. Lorsqu'un liquide dilué, un tensioactif ou un solide est soumis à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB un groupe témoin de solvant/véhicule concurrent afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'efficacité de l'essai. On utilisera uniquement des solvants/véhicules dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée.

39. Une substance reconnue pour générer une réponse positive est inclus dans chaque expérience afin de vérifier l'intégrité du dispositif d'essai et de son bon fonctionnement. Cependant, afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, l'ampleur des effets irritants ne devra pas être excessive.

40. Pour les produits chimiques liquides, les témoins positifs peuvent être composés de 100% d'éthanol ou de 100% de diméthylformamide. Pour les produits chimiques solides, les témoins positifs peuvent être composés d'imidazole à 20 % (en masse volumique) dans une solution de chlorure de sodium 0.9 %, par exemple.

41. Des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un irritant oculaire dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

### **Effets mesurés**

42. L'opacité est déterminée par la quantité de lumière traversant la cornée. L'opacité de la cornée est mesurée de manière quantitative à l'aide d'un opacimètre, qui donne des valeurs d'opacité situées sur une échelle continue. L'appareil de mesure d'opacité OP-KIT est l'appareil standard qui a été utilisé lors de la validation de la méthode d'essai OPCB (9)(21). D'autres appareils ont fait l'objet d'évaluations notamment l'opacimètre Duratec (22) et l'LLBO (opacimètre basée sur la lumière laser) (12)(21)(23) (voir annexe 5). Des opacimètres similaires peuvent également être utilisés s'ils ont fait l'objet d'une démonstration de résultats acceptables des substances d'épreuve.

43. La perméabilité est déterminée par la quantité de fluorescéine sodique pénétrant la totalité des couches cellulaires de la cornée (de l'épithélium sur la surface externe de la cornée à l'endothélium sur sa surface interne). Un volume de 1 ml de solution de fluorescéine sodique (respectivement 4 ou 5 mg/ml lors d'essais portant sur des liquides et des tensioactifs et 5 mg/ml sur des solides non tensioactifs) est introduit dans la chambre antérieure du porte-cornée, en contact avec la face épithéliale de la cornée, tandis que la chambre postérieure, en contact avec la face endothéliale, est remplie d'un nouveau MEME. Le porte-cornée est ensuite incubé en position horizontale pendant  $90 \pm 5$  min à une température de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . La quantité de fluorescéine sodique passant dans la chambre postérieure est mesurée quantitativement par spectrophotométrie UV-visible. Les mesures spectrophotométriques évaluées à 490 nm sont enregistrées en tant que valeurs de densité optique (DO490) ou d'absorbance, mesurées sur une échelle continue. La perméabilité de la fluorescéine est déterminée à l'aide des valeurs de DO490 données par un spectrophotomètre visible utilisant un trajet optique standard de 1 cm (11).

44. Il est également possible d'utiliser un lecteur de plaques de microtitration 96 puits, à condition : (i) de pouvoir définir l'intervalle linéaire du lecteur de plaque servant à déterminer les valeurs de la DO490 par la fluorescéine ; et (ii) d'utiliser le bon volume d'échantillons de fluorescéine sur la plaque 96 puits afin d'obtenir des valeurs de la DO490 équivalentes au trajet optique standard de 1 cm (ce qui peut nécessiter de remplir entièrement les puits [généralement 360  $\mu\text{l}$ ]).

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Évaluation des données**

45. Une fois que les valeurs d'opacité et de perméabilité moyenne (DO490) ont été corrigées de l'opacité de fond et des valeurs DO490 de perméabilité des témoins négatifs, l'opacité moyenne et les valeurs DO490 de perméabilité pour chaque groupe de traitement doivent être combinées dans une formule dérivée empiriquement pour calculer comme suit le score in vitro (IVIS). Pour l'appareil LLBO, l'unité de mesure est le lux, l'unité de luminescence du système international, et l'opacité est définie comme la moyenne en lux/7 (23).

- IVIS avec OP-KIT = valeur moyenne d'opacité (lecture sur OP-KIT) + (15 x valeur DO490 moyenne de perméabilité)
- SIL avec LLBO = valeur moyenne d'opacité (lecture sur LLBO en lux/7) + (15 x perméabilité moyenne de la valeur de DO490)

46. D'après Sina et al. (24), la formule pour OP-KIT a été dérivée au cours d'études internes et inter-laboratoires. Les données générées pour une série de 36 composés dans le cadre d'une étude inter-laboratoires ont été soumises à une analyse à variables multiples afin de déterminer l'équation du meilleur ajustement entre les données in vivo et in vitro. Des scientifiques travaillant dans deux entreprises distinctes ont effectué cette analyse et ont dérivé des équations pratiquement identiques. Verstraelen et al. (23) ont rapporté que la formule LLBO a été déterminée lors de l'étude initiale comprenant 29 produits chimiques d'essai ; cette formule a ensuite été confirmée lors d'une étude complémentaire sur 80 puis 65 produits chimiques (12) ainsi que lors de l'étude inter-laboratoire sur les 13 substances d'épreuve (25).

47. Les valeurs d'opacité et de perméabilité doivent également être évaluées de manière indépendante afin de déterminer si un produit chimique testé a provoqué une corrosion ou une forte irritation pour un seul des deux paramètres (voir « Critères de décision »).

### **Critères de décision**

48. Le modèle de prédiction déterminant pour l'identification des produits chimiques induisant des lésions oculaires graves pour l'œil (catégorie 1 de SGH de l'O.N.U.) par rapport aux produits chimiques ne nécessitant pas de classifications pour l'irritation oculaire ou pour les dommages lésions oculaires graves (ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'O.N.U.) sont fournies ci-dessous :

Opacimètre 1	Opacimètre 2	SGH de l'O.N.U.
<b>OP-KIT* et Duratec</b>	<b>LLBO**</b>	
IVIS = 3	SIL = 30	Pas de catégorie
<3; IVIS = 55	SIL > 30 et lux/7 = 145 et DO <sub>490</sub> = 2.5	Aucune prédiction ne peut être faite
IVIS > 55	SIL > 30 et lux/7 = 145 et DO <sub>490</sub> > 2.5 ou LIS > 30 et lux/7 > 145	Catégorie 1

\* Sur la base de données de l'ICCVAM contenant 113 substances et 100 mélanges (1)(2)(3)(22)

\*\* Sur la base de l'étude d'évaluation de LLBOL contenant 145 substances (12).

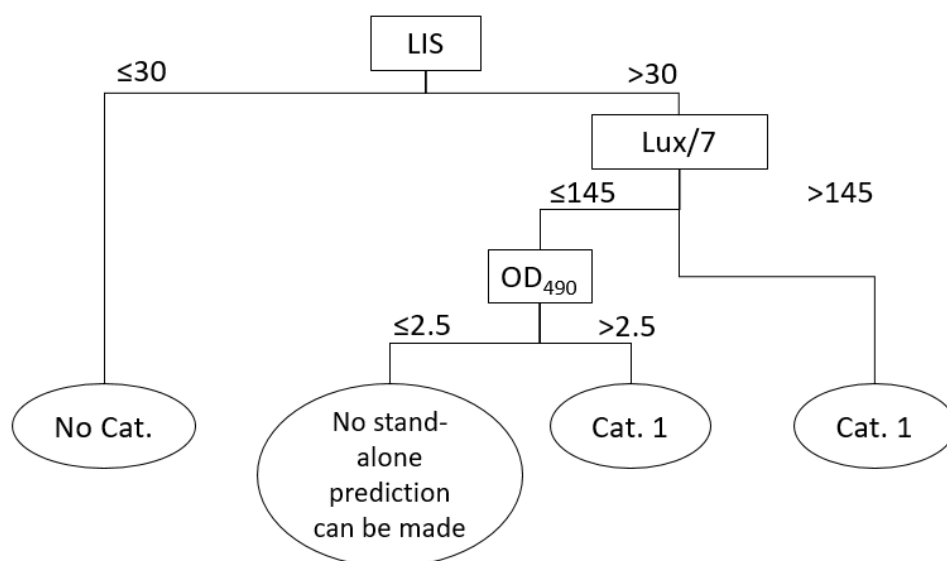


Figure 1: Modèle prédictif de la méthode OPCB LLBO

Traduction : LIS : Score d'irritation obtenu avec la méthode OPCB LLBO

No standalone prediction can be made; Aucune prediction definitive ne peut être établie

OD : densité optique (DO)

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

49. Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif présente une valeur comprise dans un intervalle de deux écarts-types autour de la moyenne historique du IVIS pour l'appareil OP-KIT. Pour l'utilisation de l'appareil LLBO, un essai est considéré acceptable si le contrôle positif présente une valeur comprise dans un intervalle de deux écarts-types autour de la moyenne historique de l'opacité (définie en lux/7). Le contrôle positif qui doit être mise à jour au moins tous les trois mois, ou à chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Les réponses du témoin négatif ou du témoin de solvant/véhicule doivent donner des valeurs d'opacité et de perméabilité situées en-deçà des limites maximales établies pour les valeurs d'opacité et de perméabilité de fond des cornées bovines traitées avec les témoins négatifs ou les témoins de solvant/véhicule correspondants. Une seule expérience composée d'au moins trois cornées doit être suffisante pour tester un produit chimique quand la prédiction résultante est sans équivoque. Cependant, dans le cas de résultats équivoques dans la première expérience, une seconde expérience devrait être considéré (mais pas nécessairement requise), ainsi qu'une troisième tentative dans le cas de prédictions discordants entre les deux premières expériences. Dans ce contexte, un résultat en première tentative est considéré comme équivoque si les prédictions résultant des trois cornées ne sont pas concordantes, comme suit :

- Deux des trios cornées ont donné des prédictions discordantes par rapport à la moyenne des trois cornées, ou
- Une des trois cornées a donné une prédiction discordante de la moyenne des trois cornées, et le résultat discordant pour :
  - OP-KIT : était supérieur à 10 unités IVIS de la valeur critique de 55 ;

- LLBO : prédiction de catégorie 1 du SGH de l'ONU basée sur l'opacité (Lux/7, opacité moyenne > 145), mais une des trois cornées a une opacité de (Lux/7) < 130 (12) ;
- LLBO : prédiction de catégorie 1 du SGH de l'ONU basée sur la DO (DO moyenne . 2.5), mais une des trois cornées a une DO < 2.0 (12);
- LLBO : prédiction « Pas de catégorie », sur la base du SIL (SIL moyen ≤ 30), mais une des trois cornées a une SIL > 40 (12).
- Si la répétition de l'expérience corrobore la prédiction de l'expérience initiale, alors la décision finale peut être prise sans expérience supplémentaire. Si la répétition de l'expérience fournit une prédiction discordante par rapport à la première expérience, alors une troisième et dernière expérience devrait être menée pour résoudre les prédictions équivoques, et ainsi permettre de classer le produit chimique. Il peut être accordé de ne pas faire d'expérience supplémentaire pour la classification et l'étiquetage dans le cas où l'expérience résulte en une prédiction de catégorie 1 du SGH de l'O.N.U.

## RAPPORT D'ESSAI

50. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes, dès lors qu'elles s'appliquent à l'étude:

*Produit chimique testé et témoins ;*

- Substance mono-constituant : identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
- Substance multiconstituants, UVCB ou mélange : 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 des produits chimiques testés/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, broyage) ;

*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 d'application de la méthode d'essai*

- opacimètre utilisé ;
- informations concernant l'étalonnage des appareils de mesure de l'opacité et de la perméabilité (p. ex. opacimètre et spectrophotomètre) pour assurer la linéarité des mesures ;
- type de porte-cornée utilisé (p.ex. modèle et spécifications) ;
- description des autres appareils utilisés ;

- procédure utilisée pour garantir l'intégrité (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, utilisation de données historiques sur les témoins négatifs et positifs) ;

*Critères d'acceptabilité de l'essai ;*

- intervalles de valeurs acceptables pour les témoins positifs et négatifs concurrents, d'après les données historiques ;
- le cas échéant, intervalles de valeurs acceptables pour les témoins étalons concurrents, d'après les données historiques.

*Collecte des yeux et préparation*

- identification de la source d'obtention des yeux (c'est-à-dire l'établissement fournisseur des yeux)

*Stockage et conditions de transport des yeux*

- p.ex. date et heure de la collecte, intervalle de temps avant le début de l'essai, milieu de transport et conditions de température, utilisation d'antibiotiques le cas échéant ;
- préparation et montage des cornées bovines, remarques concernant leur qualité ; adéquation entre le porte-cornée et le diamètre des cornées ; températures des porte-cornée, et critères d'utilisation pour la conduite de l'essai ;

*Procédure de l'essai*

- nombre de réplicats utilisés ;
- identité des témoins positif(s) et négatif(s) utilisés (le cas échéant le solvant utilisé et les produits chimiques de référence) ;
- description des critères d'évaluation et de décision utilisés ;
- description des critères d'acceptation de l'étude ;
- description de toute modification apportée à la procédure ;

*Résultats ;*

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai (par ex., valeurs de l'opacité et de la DO490 et IVIS or SIL calculé pour le produit chimique testé et les témoins positifs, négatifs et étalons [si inclus], y compris les données des essais répétés, le cas échéant, et la moyenne  $\pm$  écart type pour chaque essai) ;
- description des autres effets observés, y compris toute coloration de la cornée ;
- la classification in vitro selon le SGH de l'O.N.U le cas échéant.

*Discussion des résultats*

*Conclusion*

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) ICCVAM (2006). 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 [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmmer.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm)]
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à : [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) Nations Unies (2011). Système Général Harmonisé de l'Organisation des Nations Unies pour la Classification et l'étiquetage (SGH), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York et Genève: Nations Unies. Disponible à : [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/04files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html)].
- (5) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available: [[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)].
- (6) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (7) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (9) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM 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 : [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmmer.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm)].
- (10) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. 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 : [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].



- (11) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italie : Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA).
- (12) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. et Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) Adriaens, E., Verstraelen, S., et al Van Rompay, A.R.,, (2020). Overall performance of Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Laser Light-Based Opacitometer (LLBO) test method with regard to solid and liquid chemicals testing, Manuscript under preparation.
- (13) 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.
- (14) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (15) Kolle S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for In vitro Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *ATLA* 43, 1-18.
- (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., et Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. et Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (18) OECD (2011). 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. Adopté en octobre 2011. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (19) Doughty, M.J., Petrou, S. et Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (20) Collee, J. et Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (21) Van Goethem, F., Hansen, E., Sysmans, M., De Smedt, A., Vanparys, P., Van Gompel, J. (2010). Development of a new opacitometer for the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In Vitro* 24:1854-1861.

- (22) Verstraelen, S., Jacobs, A., De Wever, B., Vanparys, P. (2013). Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 27: 1298–1311.
- (23) Schrage, A., Kolle, S. N., Moreno, M. C. R., Norman, K., Raabe, H., Curren, R., ... Landsiedel, R. (2011). The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test in Routine Ocular Irritation Testing and its Improvement within the Limits of OECD Test Guideline 437. *Alternatives to Laboratory Animals*, 39(1), 37–53. <https://doi.org/10.1177/026119291103900119>.
- (24) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., et Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (25) Van Rompay, A.R, Adriaens, E.,., et al., Verstraelen, S. (2019). Multi-laboratory validation of Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Laser Light-Based Opacitometer (LLBO) test method regarding solid and liquid chemicals testing, Manuscript under preparation
- (25) OCDE (2002). Ligne directrice 405. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux. Disponible [[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)]
- (26) ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

# ANNEXE 1

## DÉFINITIONS

**Approche « bottom-up »** : approche par étape utilisé pour un produit chimique pour lequel on anticipe qu'il ne relève d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves. Cette approche commence par la détermination des produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) par rapport aux autres produits chimiques (résultats positifs).

**Approche « top-down »** : approche par étape utilisée dans le cas d'un produit chimique pour lequel on estime qu'il provoque des lésions oculaires graves ; cette approche commence par la détermination des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) par rapport aux autres produits chimiques (résultat négatif).

**Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)** : Réglementations promulguées par un certain nombre de pays et d'organismes de réglementation nationaux, décrivant les procédures de tenue à jour et d'assurance qualité des registres de laboratoires sur lesquels s'appuieront les soumissions de données aux autorités réglementaires. Elles sont aussi le sujet de la Série sur les Principes de bonnes pratiques de laboratoire et la vérification du respect de ces principes (18).

**Catégorie 1 du SGH** : Lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquées par l'application d'un produit chimique testé sur la surface antérieure de l'œil et qui ne sont pas totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application (3).

**Catégorie 2 du SGH**: voir « irritation oculaire »

**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 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 « lésions oculaires graves ».

**Effets réversibles sur l'œil** : voir « irritation oculaire ».

**Essai 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. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique testé ne peut pas être déterminé sur la base des informations existantes, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

**Fiabilité** : Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite dans un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire.

**Irritation oculaire** : Production de changements dans l'œil suite à l'application d'un produit chimique sur la surface antérieure de l'œil et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application (2); équivalent à "effets réversibles sur l'œil" et catégorie 2 du SGH de l'O.N.U.).

**Mélange** : un mélange ou une solution composée de deux substances ou plus dans lequel celles-ci ne réagissent pas (4).

**Mélange contenant des tensioactifs**: Dans le contexte de la présente Ligne directrice, il s'agit d'un mélange contenant un ou plusieurs tensioactifs(s) à une concentration finale supérieure à 5%.

**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.

**Non classé selon le SGH**: produit chimique ne relevant d'aucune classification selon le SGH pour catégorie 1 ou catégorie 2 (2A ou 2B). Ce terme est interchangeable avec "pas de catégorie".

**Normes de compétence** : Avant l'utilisation en routine d'une méthode d'essai conforme à une Ligne directrice de l'OCDE pour les essais, les laboratoires peuvent faire preuve de leurs compétences techniques en identifiant correctement la classification d'un ensemble de substances de référence (« substances d'épreuve des compétences ») sur une échelle de dangers. Un laboratoire peut recourir à ces normes pour démontrer sa compétence technique à mettre en œuvre une méthode d'essai avant de soumettre des données à des fins de classification réglementaire des dangers.

**Opacité cornéenne** : Mesure de l'étendue du caractère opaque de la cornée suite à son exposition à un produit chimique testé. Une augmentation de l'opacité cornéenne indique un endommagement de la cornée. L'opacité peut être évaluée de manière subjective, par exemple lors du test de Draize réalisé sur les yeux de lapin, ou de manière objective à l'aide d'un instrument de mesure tel qu'un « opacitomètre ».

**Opacitomètre** : Instrument servant à mesurer l'« opacité cornéenne » en évaluant la quantité de lumière transmise à travers la cornée. Il existe différents types d'opacitomètres sur le marché. L'opacitomètre OP-KIT, utilisé lors de la validation de l'essai OPCB, est composé de deux compartiments, chacun disposant de sa propre source lumineuse et d'une cellule photoélectrique. L'un des compartiments est utilisé pour la cornée traitée tandis que l'autre sert à étalonner l'instrument et à le mettre à zéro. La lumière provenant d'une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique. Ce genre d'opacitomètre permet une lecture pondérée au centre de la transmission lumineuse en mesurant les changements de voltage quand la transmission de la lumière blanche à travers la cornée est altérée. Un autre exemple est l'opacitomètre basée sur la lumière laser (ONLL), qui utilise un laser vert hélium-néon (HeNe) (classe IIA/3R) comme source lumineuse au lieu de la lumière visible (12)(21)(23). L'appareil LLBO offre l'avantage d'analyser la surface entière de la cornée, et permet donc de détecter plus efficacement les taches opaques situées à la périphérie de la cornée excisée. Les différents appareils génèrent des lectures différentes et des valeurs seuils différentes qui permettent de distinguer les différentes catégories d'irritation. Les appareils sont interchangeables sans impact sur la qualité ou la fiabilité des données.

**Perméabilité cornéenne** : Mesure quantitative de l'endommagement de l'épithélium cornéen via la détermination de la quantité de fluorescéine sodique traversant toutes les couches cellulaires de la cornée.

**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 testé 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 des aspects de sa « pertinence ». Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place du terme « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

**Produit chimique testé** : produit chimique (substance ou mélange) évalué dans le cadre de cet essai.

**Score d'irritation in vitro (IVIS)** : Formule dérivée empiriquement et utilisée dans les essais OPCB effectués avec l'appareil OP-KIT, dans laquelle les valeurs d'opacité moyenne et de perméabilité moyenne pour chaque groupe de traitement sont combinées pour obtenir le score in vitro unique de chaque groupe de traitement.  $IVIS = \text{valeur d'opacité moyenne} + (15 \times \text{valeur moyenne de perméabilité})$ .

**Score d'irritation LLBO (SIL)**: Formule dérivée empiriquement et utilisée dans les essais OPCB effectués avec l'appareil LLBO, dans laquelle les valeurs d'opacité moyenne et de perméabilité moyenne pour chaque groupe de traitement sont combinées pour obtenir le score in vitro unique de chaque groupe de traitement.  $SIL = \text{valeur d'opacité moyenne lue sur le LLBO en } (lux/7) + (15 \times \text{valeur de perméabilité moyenne})$ .

**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 (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 (4).

**Substance provoquant des lésions oculaires graves** : (a) Substance provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires ; (b) Substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH, la catégorie 1 de l'EPA ou la catégorie R41 de l'UE (1)(2)(3).

**Substance étalon** : Substance utilisée en tant que référence, en comparaison à une substance d'essai. Une substance étalon doit présenter les propriétés suivantes : (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables ; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances soumises à l'essai ; (iii) posséder des caractéristiques physiques/chimiques connues ; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus ; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

**Tensioactif**: Aussi appelé agent de surface; substance telle qu'un détergent, qui peut réduire la tension superficielle d'un liquide et donc lui permettre de mousser ou pénétrer des solides ; aussi appelé agent mouillant.

**Taux de faux négatifs** : Proportion de substances positives faussement identifiées comme négatives par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

**Taux de faux positifs** : Proportion de substances négatives faussement identifiées comme positives 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 la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai 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.

**Témoin négatif** : Réplique non traitée contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

**Témoin positif** : Réplique contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, la sévérité de la réponse ne devra pas être excessive.

## ANNEXE 2

## VALEUR PRÉDICTIVE DE LA MÉTHODE D'ESSAI OPCB

**Tableau 1 : Valeur prédictive de la méthode OPCB avec OP-KIT pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves [Cat. 1 ou Pas cat. 1 (Cat. 2 + « sans catégorie ») du SGH de l'ONU (1)(2)(3).**

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
SGH de l'ONU	191	78.53	150/191	86.15	56/65	13.85	9/65	74.60	94/126	25.40	32/126

**Tableau 2 : Valeur prédictive de la méthode OPCB avec OP-KIT pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« non-irritants ») [« sans catégorie » ou Pas « sans catégorie » (Cat. 1 + Cat. 2) du SGH de l'ONU (1)(2)(3)..**

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
SGH de l'ONU	196	68.88	135/196	100	107/107	0	0/107	31.46	28/89	68.54	61/89

**Tableau 3 : Valeur prédictive de la méthode OPCB avec LLBO pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves [Cat. 1 ou Pas cat. 1 (Cat. 2 + « sans catégorie ») du SGH de l'ONU (12).**

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		% <sup>a</sup>	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
SGH de l'ONU	145	77.93	145	75.89	56	24.14	56	79.21	89	20.79	89

<sup>a</sup> : Les proportions indiquées dans le tableau sont basées sur des calculs pondérés. Pour chaque produit chimique testé, tous les résultats ont été pris en compte et un facteur de correction a été appliqué pour que tous les produits chimiques testés aient le même poids (poids = 1).

**Tableau 4 : Valeur prédictive de la méthode OPCB avec LLBO pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (« non-irritants ») [« sans catégorie » ou Pas « sans catégorie » (Cat. 1 + Cat. 2) du SGH de l'ONU (12).**

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		% <sup>a</sup>	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
SGH de l'ONU	145	82.76	145	93.75	104	6.25	104	54.88	41	45.12	41

<sup>a</sup> : Les proportions indiquées dans le tableau sont basées sur des calculs pondérés. Pour chaque produit chimique testé, tous les résultats ont été pris en compte et un facteur de correction a été appliqué pour que tous les produits chimiques testés aient le même poids (poids = 1).



## ANNEXE 3

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI  
OPCB

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 13 substances recommandées dans le tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées 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) (17) et du SGH des Nations Unies (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou Non classé) (4). La disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et l'existence de données *in vitro* de bonne qualité obtenues grâce à la méthode OPCB. Les données de référence figurent dans le Récapitulatif simplifié (3) et dans les *Background Review Documents* de l'ICCVAM pour la méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (2)(27).

Lorsque l'une des substances du tableau n'est pas disponible ou lorsque sa non utilisation est justifiable, une autre substance, ayant la même forme physique et la même classification *in vivo*, et pour laquelle des données de référence adéquates *in vivo* et *in vitro* sont disponibles, peut être utilisée (par exemple une des substances de référence (2)(3), pourvu que les mêmes critères de sélection tels que décrits dans le Tableau 1 soient appliqués). L'utilisation d'une substance d'épreuve alternative soit être justifiée.

Tableau 1 : Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode OPCB

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique <sup>1</sup>	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> <sup>2</sup>	Classification OPCB
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide benzoïque	65-85-0	Acide carboxylique	Solide	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 <sup>4</sup>	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction définitive n'est possible
Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Aucune prédiction définitive n'est possible
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2 <sup>3</sup>	Aucune prédiction définitive n'est possible
EDTA, sel dipotassique	25102-12-9	Amine, Acide carboxylique (sel)	Solide	Non classé	Non classé
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polyéther	Liquide	Non classé	Non classé
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Halogénure d'acyle	Solide	Non classé	Non classé
Phénylbutazone	50-33-9	Hétérocyclique	Solide	Non classé	Non classé
Lauryl éther de polyoxyéthylène 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alcool	Liquide	Non classé	Non classé

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

<sup>1</sup> Des catégories chimiques ont été assignées à chaque substance en utilisant un schéma de classification standard, basé sur le système de classification des National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponible à l'adresse : <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>2</sup> D'après les résultats issus de l'essai sur œil de lapin *in vivo* (LD OCDE 405) (17) et en utilisant le SGH de l'ONU (4).

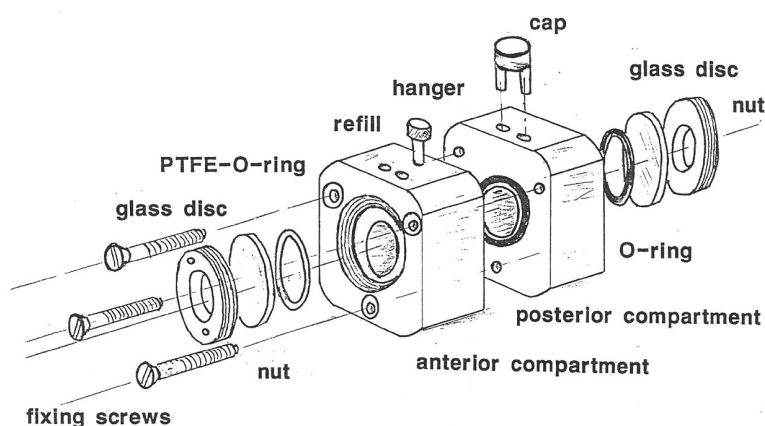
<sup>3</sup> La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 sur 3 ou 2 sur 3 animaux le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* est 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.

<sup>4</sup> Le Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl peut générer des résultats variables dans différents laboratoires en fonction du fournisseur et peut être considéré tel que suggéré dans l'annexe 3, paragraphe 2.

## ANNEXE 4

### LE PORTE-CORNÉE POUR LA MÉTHODE OPCB

1. Les porte-cornées pour OPCB sont fabriqués à partir d'un matériau inerte (polypropylène par exemple). Ils se composent de deux parties (une chambre antérieure et une chambre postérieure) et possèdent deux chambres internes cylindriques identiques. Chaque chambre, d'une contenance de 5 ml, est fermée par une vitre à travers laquelle les mesures d'opacité sont enregistrées. Chacune des chambres internes mesure 1.7 cm de diamètre et 2.2 cm de profondeur<sup>1</sup>. Un joint torique situé au niveau de la chambre postérieure empêche toute fuite. La cornée est placée face endothéliale dessous, sur le joint torique de la chambre postérieure, et la chambre antérieure est placée du côté épithélial de la cornée. Les chambres sont maintenues en place par trois vis en acier inoxydable situées sur les bordures extérieures du porte-cornée. Chaque chambre comporte à son extrémité une vitre amovible permettant d'accéder facilement à la cornée. Un joint torique placé entre la vitre et la chambre empêche toute fuite. L'introduction et le vidage du milieu et des composés d'essai se font par deux trous situés sur la face supérieure de chaque chambre. Pendant le traitement et les périodes d'incubation, ils sont fermés par des capuchons en caoutchouc. La transmission de la lumière à travers les porte-cornées peut varier dans la mesure où les effets de l'usure ou l'accumulation de certains résidus chimiques sur les trous des chambres internes ou sur les vitres peut modifier la répartition ou la réflectance de la lumière. En conséquence, on peut observer une augmentation ou une diminution de la lumière de référence transmise (et une variation inversement proportionnelle des mesures d'opacité de référence) à travers les porte-cornées, ces changements pouvant être marqués dès les premières mesures d'opacité de la cornée dans les chambres individuelles (autrement dit, les valeurs initiales d'opacité de la cornée dans des porte-cornées individuels spécifiques peuvent facilement varier de plus de 2 ou 3 unités d'opacité par rapport aux valeurs de référence attendues). Chaque laboratoire doit envisager d'élaborer un programme pour évaluer les variations de transmission de la lumière à travers les porte-cornées, selon la nature des produits chimiques testés et la fréquence d'utilisation des chambres. Pour établir des valeurs de référence, on peut contrôler les porte-cornées avant l'utilisation en routine en mesurant les valeurs d'opacité (ou de transmission de la lumière) de référence des chambres remplies de tout le milieu, sans cornées. Les porte-cornées peuvent ensuite être contrôlés périodiquement pour vérifier si la transmission de la lumière varie durant les périodes d'utilisation. Chaque laboratoire peut établir la fréquence de contrôle des porte-cornées, selon les produits chimiques testés, la fréquence d'utilisation et les variations observées par rapport aux valeurs d'opacité cornéenne de référence. Si l'on observe des variations notables de la lumière transmise à travers les porte-cornées, il convient d'appliquer les procédures appropriées de nettoyage et/ou de polissage de la surface interne des porte-cornées voire de la remplacer.



*De gauche à droite :*

*Disque de verre / Joint torique en PTFE / Orifice de remplissage / Crochet / Capuchon / Disque de verre / Écrou  
Vis de fixation / Écrou / Compartiment antérieur / Compartiment postérieur / Joint torique*

<sup>1</sup> Les dimensions indiquées ici sont celles d'un porte-cornée utilisé pour des bovins âgés de 12 à 60 mois. Pour des animaux entre 6 et 12 mois, le porte-cornée est conçu de manière à posséder des chambres d'une contenance de 4 ml chacune et dont les dimensions intérieures sont de 1.5 cm de diamètre et 2.2 cm de profondeur. Pour tout porte-cornée nouvellement conçu, il est essentiel que le rapport entre la surface cornéenne exposée et le volume de la chambre postérieure soit le même que celui du porte-cornée classique. Cette condition est indispensable pour garantir que les valeurs de perméabilité sont correctement déterminées pour le calcul du SIIV par la formule donnée.

## ANNEXE 5 – L'OPACITOMÈTRE

1. L'opacitomètre est un appareil permettant de mesurer la transmission de la lumière. L'appareil type est l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France) utilisé pour valider la méthode OPCB. La lumière d'une lampe halogène y est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite mesurée électroniquement sous forme de tension et comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique. Les unités d'opacité sont alors définies. Un autre appareil possible est le Laser Light-Based Opacitometer (LLBO) de Peira Scientific Instruments (Beerse, Belgique), dont on a montré que les performances étaient similaires à celles de l'OP-KIT (23)(12). Le LLBO utilise un laser vert (classe IIa/3R) hélium-néon (HeNe) comme source de lumière et non une lumière visible. Fonctionnant à une longueur d'onde de 543.5 nm, il produit un faisceau de lumière monochromatique non polarisé cohérent (0.81 mm) d'une puissance de 10.0 mW dans la partie verte du spectre visible. Le LLBO a l'avantage d'analyser l'intégralité de la surface cornéenne et permet donc de détecter plus efficacement les points opaques situés à la périphérie des cornées prélevées. D'autres types d'opacitomètres présentant une configuration différente (par exemple, ne nécessitant pas de mesurer en parallèle le compartiment témoin et le compartiment expérimental) peuvent être utilisés s'il est prouvé qu'ils donnent des résultats similaires à ceux de l'équipement validé.

2. L'opacitomètre fournit une réponse linéaire par le biais d'un éventail de mesures d'opacité couvrant les seuils utilisés pour les différentes classifications décrites par le modèle de prévision (c'est-à-dire, jusqu'aux seuils déterminant le caractère corrosif/fortement irritant). Dans le cas de l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France), afin de garantir des mesures linéaires et précises jusqu'à 75-80 unités d'opacité, il est nécessaire d'étalonner l'opacitomètre à l'aide d'une série de calibreurs. Les calibreurs sont placés à l'intérieur de la chambre d'étalonnage (une chambre de porte-cornée destinée à contenir les calibreurs) et une mesure des calibreurs est réalisée sur l'opacitomètre. La chambre d'étalonnage est conçue pour maintenir les calibreurs approximativement à la même distance de la source lumineuse et de la cellule photoélectrique que celle où se trouveront les cornées lors des mesures d'opacité. Les valeurs de référence et le point déterminé initialement dépendent du type d'équipement utilisé. Il convient de s'assurer de la linéarité des mesures d'opacité en appliquant les procédures appropriées (en fonction de l'instrument). Par exemple, pour l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France), l'opacitomètre est tout d'abord étalonné à 0 unité d'opacité en utilisant la chambre d'étalonnage sans calibreur. Trois calibreurs différents sont ensuite placés l'un après l'autre à l'intérieur de la chambre d'étalonnage, et l'opacité est mesurée. Les calibreurs 1, 2 et 3 présentent des mesures d'opacité égales à leur valeur de consigne, soit respectivement 75, 150 et 225 unités d'opacité,  $\pm 5\%$ . Dans le cas de l'équipement LLBO de Peira Scientific Instruments (Beerse, Belgique), l'opacitomètre est allumé 30 minutes avant utilisation. Il s'agit d'un dispositif à compartiment unique et faisceau unique. L'unité de mesure est le lux, l'unité d'éclairement lumineux du SI. Elle est utilisée en photométrie pour mesurer l'intensité apparente de la lumière qui touche ou traverse une surface, les longueurs d'onde étant pondérées suivant une fonction de luminosité qui est un modèle uniformisé de la perception humaine de la luminosité (23)(12). Les valeurs de départ sont réglées à '2000  $\pm$  20 lux', un porte-cornée « vide » est placé dans le boîtier de mesure et les valeurs en lux de l'appareil mesurant l'éclairement lumineux sont enregistrées. Ensuite, une vérification est réalisée avant chaque série de mesures pour tester l'appareil et garantir qu'il fonctionne parfaitement et produit des mesures fiables. L'appareil est vérifié à l'aide de quatre filtres neutres en verre (DO 0.3, 0.6, 0.8 et 1.0), conformément aux indications du fabricant. Après la vérification, l'appareil est prêt pour la mesure des valeurs d'opacité de la cornée (non) traitée. Remplacer

le porte-cornée « vide » par un porte-cornée contenant une cornée (non) traitée, enregistrer la valeur en lux, remplacer par un autre porte-cornée. Après avoir réalisé les mesures en triple, contrôler l'indication '2000 lux' à l'aide du porte-cornée « vide » et la régler au besoin. Ensuite, l'appareil est prêt pour la mesure des trois porte-cornée suivants contenant des cornées (non) traitées (21)(23)(12).

**Tableau.** Caractéristiques des opacitomètres OP-KIT et LLBO (11)(12)(21)(23)

<b>Opacitomètre à lumière visible (OP-KIT)</b>	<b>Opacitomètre à lumière laser (LLBO)</b>
<b>Lumière blanche (polychromatique)</b>	<b>Lumière laser (monochromatique)</b>
<b>Deux sources de lumière de durées de vie différentes (faisceau double)</b>	<b>Une source de lumière (faisceau unique)</b>
<b>La zone centrale est privilégiée dans la mesure</b>	<b>La cornée tout entière est analysée</b>
<b>Non linéaire</b>	<b>Linéaire</b>
<b>-</b>	<b>La largeur du faisceau de lumière est réglable</b>