

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

Toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. Une première Ligne directrice pour les essais de toxicité aiguë par inhalation (403) a été adoptée en 1981 et révisée depuis (1). Suite à l'adoption, en 2001, de la Ligne directrice révisée n° 423 sur la méthode par classe de toxicité aiguë par voie orale (5), il est apparu approprié de développer une méthode par classe de toxicité aiguë par inhalation (2) (3) (4). Une évaluation rétrospective des performances de la méthode d'essai par classe de toxicité aiguë pour la toxicité aiguë par inhalation a montré que cette méthode était utilisable à des fins de classification et d'étiquetage (6). La Ligne directrice pour les essais de toxicité par inhalation faisant appel à la méthode par classe de toxicité aiguë permettra l'utilisation d'étapes successives de concentrations cibles fixées pour déterminer la classe de toxicité de l'article d'essai. Bien que la létalité soit le principal effet mesuré, les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance ou de détresse sévère sont euthanasiés afin de minimiser leur souffrance. Des précisions concernant les effets mesurés éthiquement acceptables sont disponibles dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE (7).

2. On trouvera dans le document d'orientation N° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation des indications pour la conduite et l'interprétation de la présente Ligne directrice pour les essais (8).

3. Le document d'orientation 39 (8) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette Ligne directrice.

4. Cette méthode fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement des substances dans le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations unies (NU) pour les substances présentant une toxicité aiguë (9). Si des estimations ponctuelles des valeurs de la CL_{50} ou des analyses de la courbe concentration-réponse sont nécessaires, il convient d'utiliser la Ligne directrice pour les essais n° 403 (1). Pour plus d'informations sur le choix des Lignes directrices pour les essais, il convient de se reporter au document d'orientation 39 (8). La présente Ligne directrice pour les essais n'est pas spécifiquement destinée à tester des articles spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à cette Ligne directrice, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur l'article d'essai, y compris les études © OCDE, (2009).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

existantes dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de l'article d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité *in vitro* ou *in vivo* auxquels elle a été soumise; son(s) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées. Les concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance ou une détresse sévères, du fait de propriétés corrosives¹ ou fortement irritantes, ne sont pas testées à l'aide de cette Ligne directrice pour les essais, cf. document d'orientation 39 (8).

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Le principe de cet essai est d'obtenir, avec un processus séquentiel, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë par inhalation de l'article d'essai, pour parvenir à son classement avec une exposition de 4 heures. Des objectifs réglementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. Les essais pour chacun des niveaux de concentration définis porteront sur 3 animaux de chaque sexe. En fonction de la mortalité et/ou de l'état moribond des animaux, 2 étapes peuvent suffire pour permettre de juger de la toxicité aiguë de l'article d'essai. S'il est prouvé que l'un des sexes est plus sensible à l'article d'essai, l'essai peut se poursuivre avec seulement les animaux de ce sexe. Le résultat de l'étape précédente détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

- a) l'arrêt de l'essai,
- b) un essai sur trois animaux par sexe, ou
- c) un essai sur 6 animaux, tous du sexe le plus sensible à l'article d'essai, la limite inférieure de la classe de toxicité devant être déterminée à partir d'essais portant sur 6 animaux par groupe de concentration d'essai, indépendamment du sexe.

7. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés, et sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE n°19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (7).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces animales

8. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

9. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder,

¹ L'évaluation de la corrosivité peut reposer sur un avis d'expert basé sur les éléments suivants : données expérimentales sur l'homme et l'animal, données (*in vitro*) existantes [voir, par exemple, les Lignes directrices n° 430 (10), 431 (11) ou 435 (12), valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente.

pour chaque sexe, $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

10. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés « nez seul », il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés « corps entier » à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol par la fourrure de leurs congénères. A l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

11. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de l'article d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition « nez seul » (qui inclut les dispositifs « tête seule », « nez seul » et « museau seul ») est privilégié. Le mode d'exposition « nez seul » est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition « corps entier » peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais elle est justifiée dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition « corps entier », on veillera à ce que le « volume » total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (8) décrit les principes des techniques d'exposition « corps entier » ou « nez seul », ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

12. Il est recommandé une durée fixe d'exposition de quatre heures, sans compter le temps d'équilibration. D'autres durées d'exposition sont possibles pour répondre à des besoins spécifiques, cependant une justification devra être apportée dans le rapport d'étude, cf. document d'orientation 39 (8). Les animaux exposés « corps entier » demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de l'article d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition « corps entier », les animaux peuvent boire de l'eau.

13. Les animaux sont exposés à l'article d'essai présenté sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les articles d'essai chimiquement réactifs ou hygroscopiques sont testés sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

14. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm , avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1.5 et 3.0 (8) (13) (14). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide du tractus respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de l'article d'essai dans un véhicule

15. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de l'article d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule ; en règle générale l'eau est choisie de préférence. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer l'article d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de l'article d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de l'article d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer l'article d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

16. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude de l'article d'essai préparé dans un véhicule, celui-ci est considéré comme non toxique à la concentration testée ; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

17. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, suivi en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de la production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition « nez seul » lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de

produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant l'article d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (8) (15). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

18. La température de la chambre d'exposition est maintenue à $22\pm 3^{\circ}\text{C}$. Dans les cas d'exposition « nez seul » et « corps entier » l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est suivie et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour les durées plus courtes. Le taux d'humidité relative est idéalement compris entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque l'article d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de l'article d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai : concentration nominale

19. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de l'article d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai : concentration réelle

20. La concentration réelle est la concentration de l'article d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à l'article d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.

21. Il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de l'article d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de l'article d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes : temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou

chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de l'article d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

22. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible, et suivie soit en continu, soit par intermittence en fonction de la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, la prochaine concentration d'essai devra utiliser quatre échantillons par exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de l'article d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95} . Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (8).

23. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou articles d'essai propulsés à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principe actif dans la préparation du produit d'essai. Quand l'article d'essai est un mélange (une préparation, par exemple), la concentration analytique devra être indiquée pour la préparation totale et pas uniquement pour le principe actif ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (8).

Substance d'essai : répartition granulométrique

24. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade ou un autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, cf. document d'orientation 39 (8). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au maximum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 14).

MODE OPERATOIRE

Essai principal

25. Pour chaque étape, 3 animaux de chaque sexe, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à l'article d'essai, seront utilisés. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées « nez seul », il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le niveau de concentration à utiliser comme dose initiale est choisi parmi les quatre niveaux fixés ; le

niveau de concentration initiale est celui le plus susceptible de présenter une toxicité pour certains des animaux traités. Les schémas d'essai pour les gaz, les vapeurs et les aérosols (présentés dans les annexes 1 à 3) correspondent aux essais effectués aux valeurs limites des catégories SGH 1 à 4 pour les gaz (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (annexe 1), pour les vapeurs (0.5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (annexe 2) (9) et pour les aérosols (0.05, 0.5, 1, 5 mg/l/4 h) (annexe 3). La catégorie 5 se rapporte à des concentrations dépassant les concentrations limites respectives. Chacune des concentrations de départ possède son propre schéma d'essai. En fonction du nombre d'animaux morts ou euthanasiés, le mode opératoire d'essai suit les flèches indiquées jusqu'à ce qu'une catégorisation puisse être établie.

26. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition des animaux au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Il est recommandé d'espacer de trois à quatre jours les expositions à chaque niveau de concentration afin de permettre l'observation d'une toxicité retardée. L'intervalle de temps peut être ajusté, par exemple en cas de réponses peu concluantes.

Essai limite

27. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que l'article d'essai sera virtuellement non toxique, c.à.d. qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Des informations sur la toxicité de l'article d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des composés, produits ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de l'article d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé; le document d'orientation 39 fournit de plus amples informations à ce sujet (8).

28. Selon le mode opératoire normal, trois animaux par sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à l'article d'essai, sont exposés à des concentrations de 20 000 ppm pour les gaz, 20 mg/l pour les vapeurs et 5 mg/l pour les poussières/brouillards. Si elles sont atteintes, ces concentrations servent de limite d'essai pour cette Ligne directrice. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des articles d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, cf. document d'orientation 39 (8). Selon le SGH, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux. Les essais en catégorie 5 du SGH ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (11), et une justification est alors fournie dans le rapport d'essai. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

Observations

29. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés. Toutes les

observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec les effets liés au traitement. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

30. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différenciation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

31. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci, et au moins les jours 1, 3 et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite) ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveillera donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 % ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période post-exposition.

Pathologie

32. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

33. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Les organes examinés peuvent être ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue et ceux montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les articles d'essai réactifs à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiqués pour chaque

groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, y compris : nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire;
- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat;
- Nombre, âge et sexe des animaux;
- Méthode de randomisation;
- Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau);
- Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie;

Substance d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation);
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu;

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau);
- Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude;

Chambre d'inhalation

- Description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume;
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère;
- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle;
- Source d'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai;
- Différence de pression (positive ou négative);

- Orifices d'exposition par chambre (« nez seul ») ou emplacement des animaux dans le système (« corps entier »);
- Homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai;
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition;
- Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition (« nez seul ») ou rapport du volume de l'animal à la chambre (« corps entier »);
- Informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone;
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95});
- Nombre de changements de volume par heure;
- Doseurs (s'il y en a);

Données concernant l'exposition

- Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale;
- Concentrations nominales (masse totale d'article d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre);
- Concentrations réelles de l'article d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément;
- Toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.); les unités de volume (ppm, ppb) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses;
- Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées;

Conditions expérimentales

- Détails sur la préparation de l'article d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de l'article d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de l'article d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de l'article d'essai;
- Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci;
- Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de l'article d'essai à partir du milieu d'échantillonnage);
- Justification du choix des concentrations d'essai;

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation;

- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation;
- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g ;
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité et durée des effets);
- Poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité;
- Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.
- Classement dans les catégories SGH et valeur limite de la CL_{50} ;

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente Ligne directrice, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules;
- La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis;
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude;
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés;
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (7).

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2009), Toxicité aiguë par inhalation. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques No. 403, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
2. Holzhütter, H-G, Genschow, E., Diener, W., et Schlede, E (2003), Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77, 243-254
3. Diener, W., Kayser, D. et Schlede, E. (1997), The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71, 537-549.
4. Diener, W. et Schlede, E. (1999), Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. *ALTEX* 1: 129-134
5. OCDE (2001), Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques No. 423, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
6. OECD (2009), Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 acute toxic class testing method for acute inhalation toxicity. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n°105. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
7. OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n°19, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
8. OECD Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
9. Nations Unies (NU) (2007), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), ST/SG/AC.10/30, ONU New York et Genève. Disponible [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_f.htm]
10. OCDE (2004). Corrosion cutanée *in vitro* : Essai de résistance électrique transcutanée (RET). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, No. 431, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
11. OECD (2004). Corrosion cutanée *in vitro* : Essai sur modèle de peau humaine. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques No. 431, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
12. OCDE (2005). Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques No. 435, OCDE, Paris. Disponible [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

13. Phalen, R.F. (2009), *Inhalation Studies: Foundations and Techniques*. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
14. SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18, 321-327.
15. Pauluhn, J. et Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27, 160-167.

Annexe 1PROCÉDURE À SUIVRE POUR CHACUNE DES CONCENTRATIONS INITIALES DANS LE CAS DES GAZ (ppm/4h)REMARQUES GÉNÉRALES

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans cette annexe indiquent la procédure à suivre.

Annexe 1 a : Concentration initiale de 100 ppm

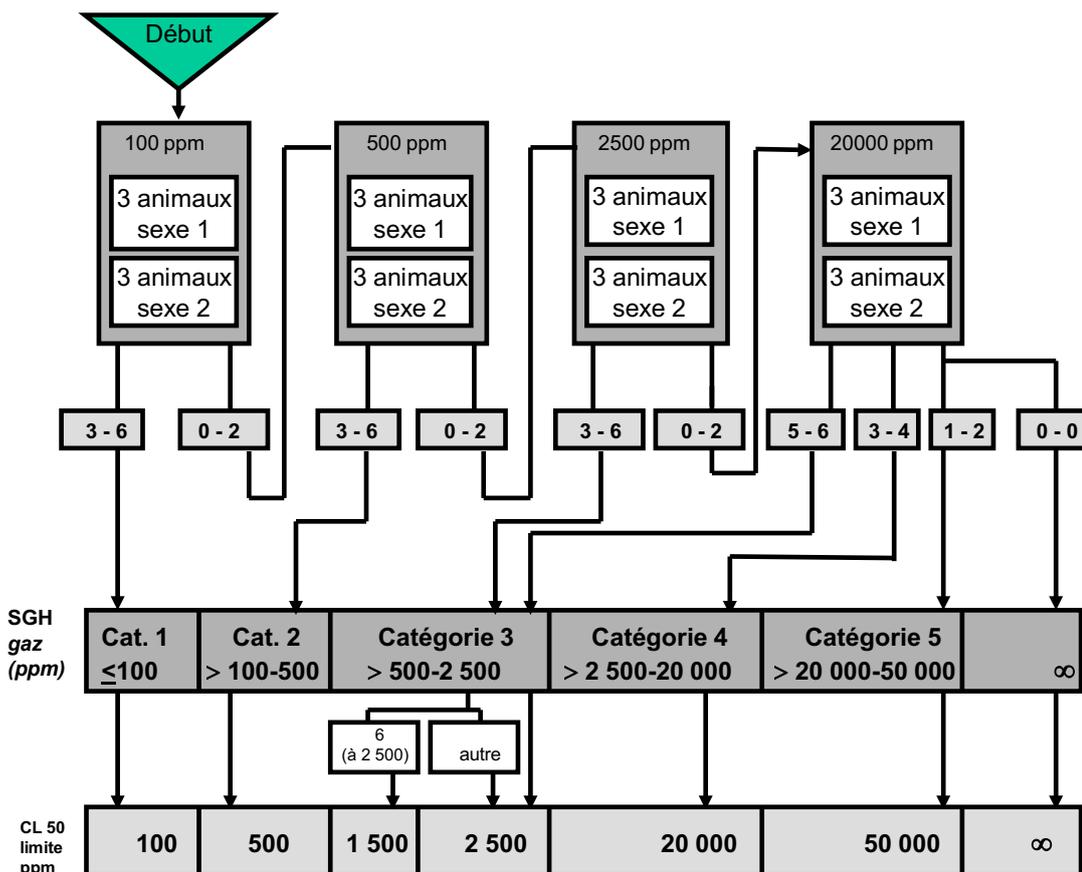
Annexe 1 b : Concentration initiale de 500 ppm

Annexe 1 c : Concentration initiale de 2 500 ppm

Annexe 1 d : Concentration initiale de 20 000 ppm

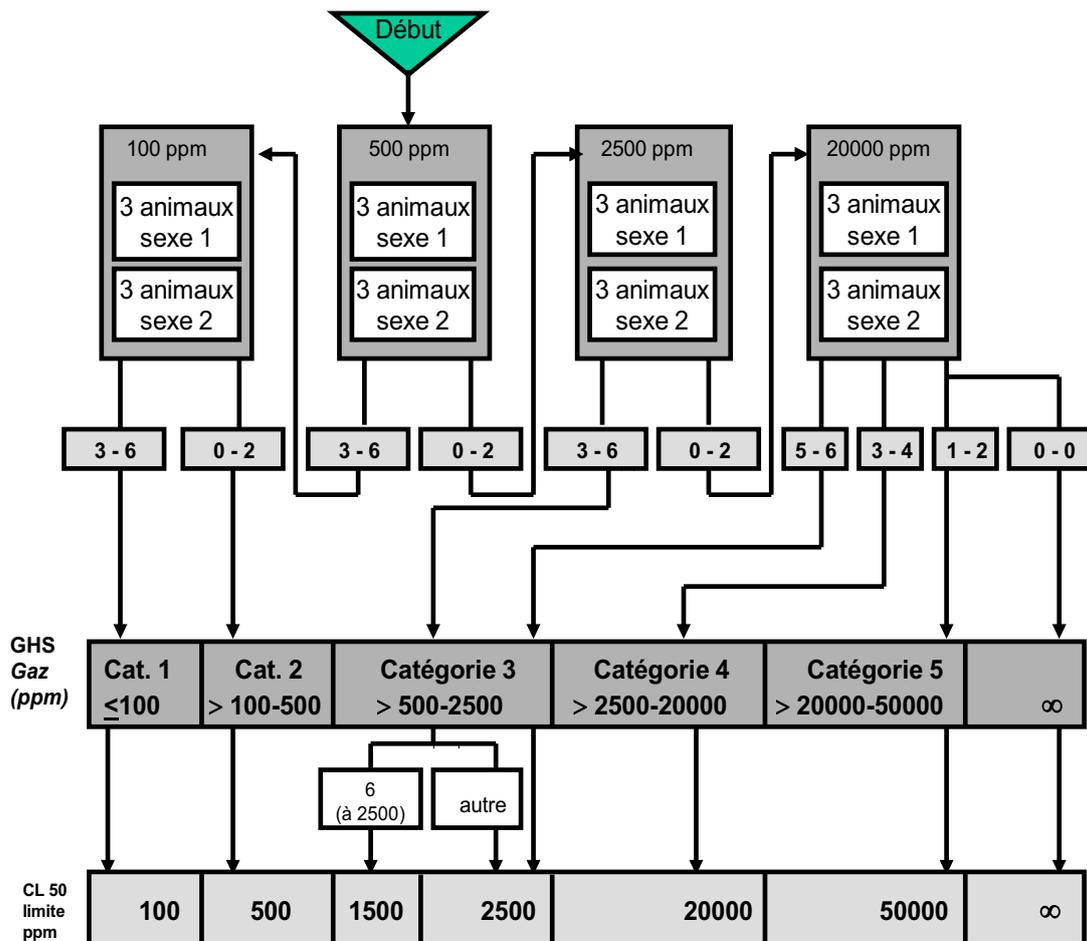
Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

ANNEXE 1 a
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 100 ppm/4 h pour les gaz



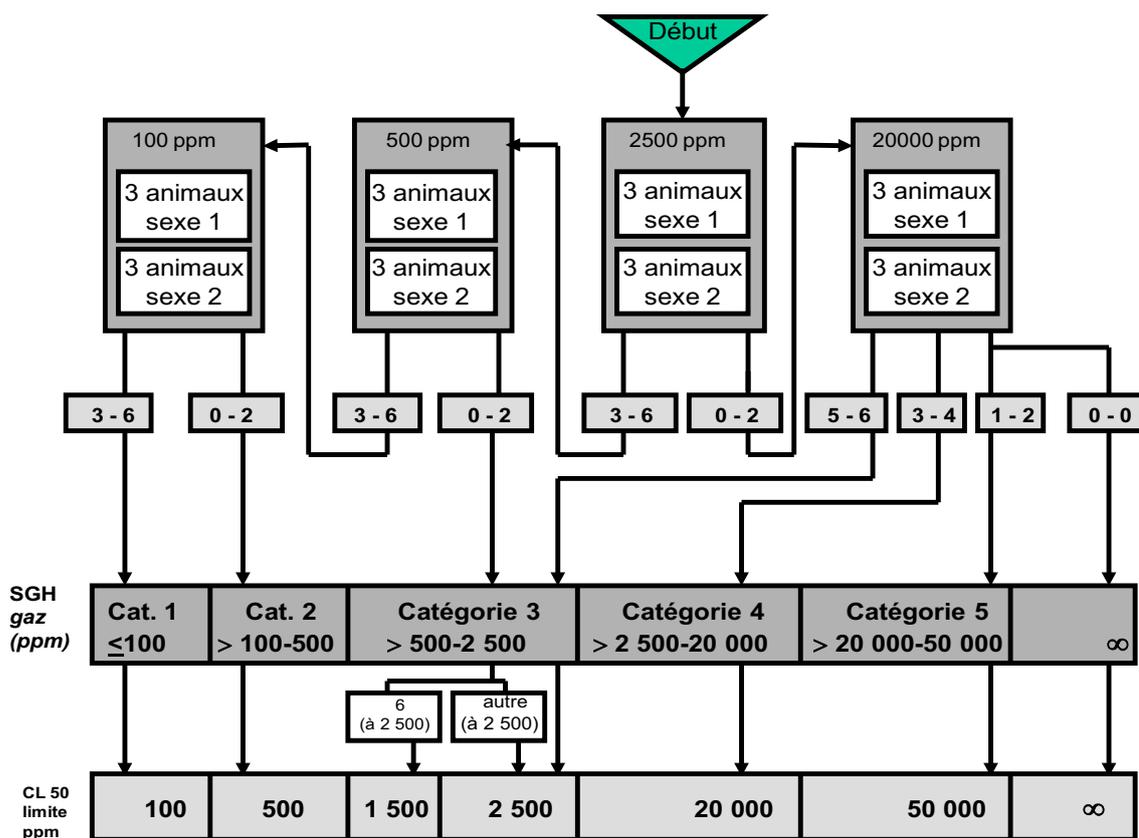
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 1 b
Toxicité aiguë par inhalation :
Schéma d'essai avec une concentration initiale de 500 ppm/4h pour les gaz



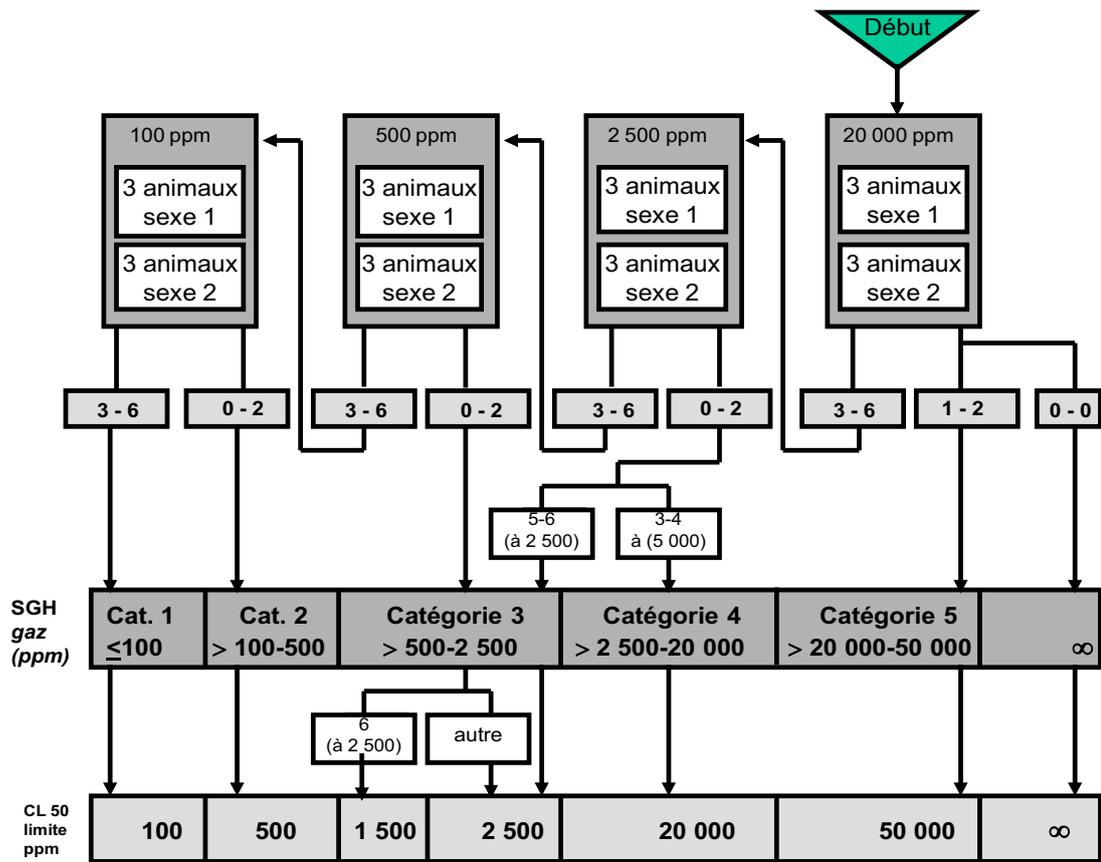
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 1 c
Toxicité aiguë par inhalation :
Schéma d'essai avec une concentration initiale de 2500 ppm/4h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 1 d
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 000 ppm/4h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

Annexe 2PROCÉDURE À SUIVRE POUR CHACUNE DES CONCENTRATIONS INITIALES DANS
LE CAS DES VAPEURS (mg/l/4h)REMARQUES GÉNÉRALES

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans cette annexe indiquent la procédure à suivre.

Annexe 2 a : Concentration initiale de 0.5 mg/l

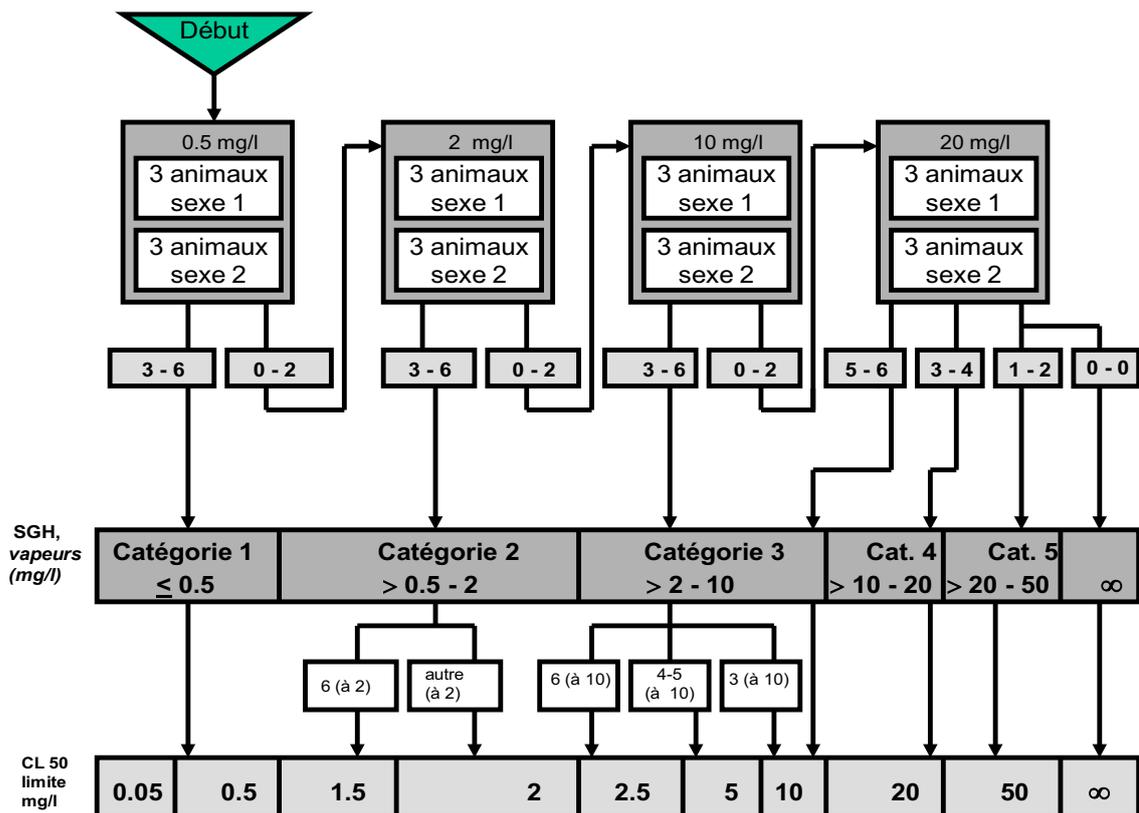
Annexe 2 b : Concentration initiale de 2.0 mg/l

Annexe 2 c : Concentration initiale de 10 mg/l

Annexe 2 d : Concentration initiale de 20 mg/l

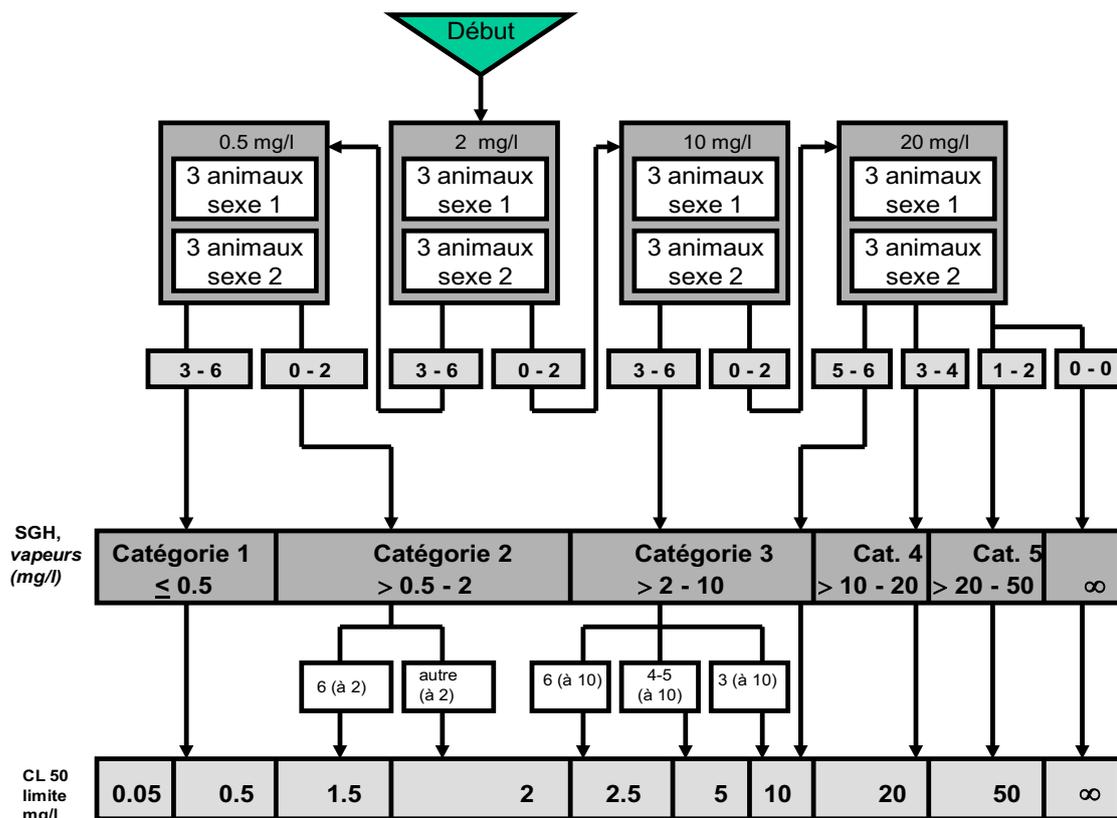
Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

ANNEXE 2 a
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.5 mg/l/4h pour les vapeurs



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 50 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 2 b
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 mg/l/4h pour les vapeurs



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 50 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 2 c
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 10 mg/l/4h pour les vapeurs

		Début										
		0.5 mg/l		2 mg/l		10 mg/l		20 mg/l				
		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1				
		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2				
		3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	5 - 6	3 - 4	1 - 2	0 - 0	
SGH, vapeurs (mg/l)	Catégorie 1 ≤ 0.5			Catégorie 2 > 0.5 - 2		Catégorie 3 > 2 - 10		Cat. 4 > 10 - 20	Cat. 5 > 20 - 50	∞		
				6 (à 2)	autre (à 2)	6 (à 10)	4-5 (à 10)	3 (à 10)				
CL 50 limite mg/l	0.05	0.5	1.5			2	2,5	5	10	20	50	∞
<p>- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape</p> <p>- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée</p> <p>- SGH : Système général harmonisé de classification</p> <p>- ∞ : non classé</p> <p>- Essai à 50 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)</p>												

ANNEXE 2 d
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 mg/l/4h pour les vapeurs

		Début								
		0.5 mg/l		2 mg/l		10 mg/l		20 mg/l		
		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		
		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		
		3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	1 - 2	0 - 0
							5-6 (à 20)	3-4 (à 20)		
SGH, vapeurs (mg/l)	Catégorie 1 ≤ 0.5	Catégorie 2 > 0.5 - 2		Catégorie 3 > 2 - 10			Cat. 4 > 10 - 20	Cat. 5 > 20 - 50	∞	
			6 (à 2)	autre (à 2)	6 (à 10)	4-5 (à 10)	3 (à 10)			
CL 50 limite mg/l	0.05	0.5	1.5	2	2,5	5	10	20	50	∞

- 3 ☉ + 3 ☺, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée

- SGH : Système général harmonisé de classification

- ∞ : non classé

- Essai à 50 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

Annexe 3**PROCÉDURE À SUIVRE POUR CHACUNE DES CONCENTRATIONS INITIALES DANS
LE CAS DES AÉROSOLS (mg/l/4h)****REMARQUES GÉNÉRALES**

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans cette annexe indiquent la procédure à suivre.

Annexe 3 a : Concentration initiale de 0.05 mg/l

Annexe 3 b : Concentration initiale de 0.5 mg/l

Annexe 3 c : Concentration initiale de 1 mg/l

Annexe 3 d : Concentration initiale de 5 mg/l

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

ANNEXE 3 a
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.05 mg/l/4h pour les aérosols

Début											
0.05 mg/l 3 animaux sexe 1			0.5 mg/l 3 animaux sexe 1			1 mg/l 3 animaux sexe 1			5 mg/l 3 animaux sexe 1		
3 animaux sexe 2			3 animaux sexe 2			3 animaux sexe 2			3 animaux sexe 2		
3 - 6	0 - 2			3 - 6	0 - 2			3 - 6	0 - 2		
			4-6 (à 1)		3 (à 1)						
SGH <i> poussières et brouillards</i>	Cat. 1 ≤ 0.05	Catégorie 2 > 0.05 - 0.5			Cat. 3 > 0.5 - 1		Catégorie 4 > 1 - 5		Catégorie 5 > 5 - 12.5		∞
		6 (à 0.5)	4-5(à 0.5)	3(à 0.5)			5-6 (à 5)	3-4 (à 5)			
CL 50 <i>limite mg/l</i>	0.05	0.125	0.25	0.5	1	2	2.5	5	12.5	∞	

- 3 ● + 3 ☉, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée

- SGH : Système général harmonisé de classification

- ∞ : non classé

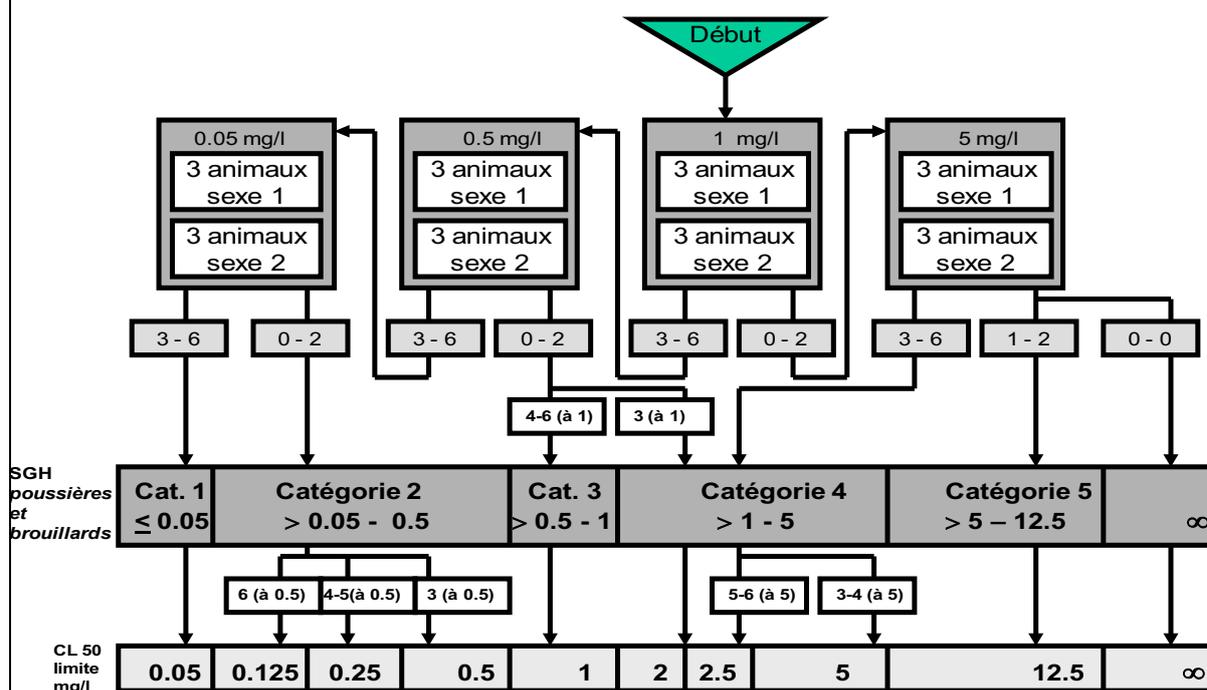
- Essai à 12.5 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 3 b
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.5 mg/l/4h pour les aérosols

Début										
	0.05 mg/l		0.5 mg/l		1 mg/l		5 mg/l			
	3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1		3 animaux sexe 1			
	3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2		3 animaux sexe 2			
	3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	1 - 2	0 - 0	
			4-6 (à 1)		3 (à 1)					
SGH <i>poussières</i> <i>et</i> <i>brouillards</i>	Cat. 1	Catégorie 2			Cat. 3	Catégorie 4		Catégorie 5		∞
	≤ 0.05	> 0.05 - 0.5			> 0.5 - 1	> 1 - 5		> 5 - 12.5		
		6 (à 0.5)	4-5 (à 0.5)	3 (à 0.5)		5-6 (à 5)	3-4 (à 5)			
CL50 <i>limite</i> <i>mg/l</i>	0.05	0.125	0.25	0.5	1	2	2.5	5	12.5	∞

- 3 ● + 3 ☹, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 12.5 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

ANNEXE 3 c
Toxicité aiguë par inhalation :
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 1 mg/l/4h pour les aérosols



SGH
poussières
et
brouillards

CL 50
limite
mg/l

- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6 : Nombre d'animaux morts ou moribonds / concentration testée
- SGH : Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 12.5 mg/l/4h : voir document d'orientation n° 39 (8)

