Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 498

Phototoxicité *in vitro* : Essai sur épiderme humain reconstitué

4 juillet 2023

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

OCDE
DES POLITIQUES MEILLEURES POUR UNE VIE MEILLEURE

OECD/OCDE 498

Adopteé :

14 juin 2021

Corrigée: le 4 juillet 2023

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

Phototoxicité in vitro : Essai sur épiderme humain reconstitué

INTRODUCTION

1. La phototoxicité (photo-irritation) est définie comme une réaction toxique aiguë causée par des produits chimiques photoréactifs après administration de ces produits par voie topique ou systémique et exposition du corps à la lumière ambiante. S'agissant de l'exposition de la peau, la réaction phototoxique survient après une exposition aigue de la peau d'abord à un produit photoréactif puis à la lumière. La méthode d'essai ne couvre pas les produits photo-sensibilisants, qui sont des produits chimiques photoréactifs qui peuvent induire une réponse via le système immunitaire des peaux exposées.

2. La présente Ligne directrice traite de l'effet de la phototoxicité sur la santé humaine dans le cadre précis de l'exposition topique de la peau à des produits chimiques phototoxiques. L'essai *in vitro* de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué (EhR) vise à identifier le potentiel phototoxique d'un produit chimique d'essai administré par voie topique sur des tissus épidermiques humains reconstitués, avec ou sans exposition à la lumière solaire simulée (cf. paragraphes 37-38 pour les caractéristiques de la lumière solaire simulée). On évalue le potentiel phototoxique en calculant la réduction relative de la viabilité cellulaire, c'est-à-dire le rapport entre les viabilités des cellules exposées au produit chimique d'essai en présence de lumière solaire simulée et en l'absence de cette lumière. Les produits chimiques identifiés par cet essai sont susceptibles d'être phototoxiques *in vivo*, après administration par voie topique sur la peau, les yeux ou d'autres épithéliums externes exposés à la lumière.

3. La présente Ligne directrice fait appel à un système d'essai *in vitro* utilisant un épiderme humain reconstitué qui reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches externes de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. Pour obtenir cet épiderme humain reconstitué, on utilise des dérivés de kératinocytes humains comme source cellulaire afin de reconstruire un modèle d'épiderme comprenant une cyto-architecture et une histologie représentatives. La méthode d'essai combine

© OCDE (2023)
L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation.

l'exposition de base à un produit chimique testé et les méthodologies d'évaluation de la viabilité telles que décrites dans la Ligne directrice 439 sur l'irritation cutanée in vitro: essai sur épiderme humain reconstitué (1), à des processus standardisés d'exposition à la lumière tels que décrits dans la Ligne directrice 432 sur l' Essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU (2). Les temps d'exposition dans la présente Ligne directrice sont plus longs que ceux décrits dans la Ligne directrice 439 afin de s'assurer que les ingrédients chimiques diffusent suffisamment dans le modèle tissulaire le plus proche des cellules ciblées où les espèces chimiques photoréactives peuvent être induites au moment de l'exposition à la lumière.

4. L'évaluation de la performance générale de la méthode d'essai se fonde sur une analyse *ad hoc* de données publiées (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10), notamment celles d'une première étude de pré-validation de la méthode d'essai publiée en 1999 (4) et faisant état d'une sensibilité de 86.7 % et d'une spécificité de 93.3 % (Phase III, ensemble de 10 produits chimiques testés à deux reprises de façon indépendante dans trois laboratoires). Les données ontété présentées au groupe de travail COLIPA sur la phototoxicité en 1999 (11). Le groupe de travail avait conclu que le modèle d'épiderme humain 3D reconstruit pouvait être un outil utile pour couvrir la biodisponibilité d'un produit chimique. Lorsque le test est utilisé en combinaison avec l'essai 3T3 NRU de phototoxicité en tant que complément, la combinaison permet une décision claire dans le cas de prédictions limites de a phototoxicité aigue. Le modèle d'épiderme humain 3D reconstruit a aussi été considéré comme avantageux dans l'évaluation de la puissance phototoxique. Une étude de suivi sur la puissance phototoxique a été mené par le Centre européen de validation des méthodes alternatives (CEVMA) entre 2003 et 2006 (12).

5. Afin de soutenir le développement d'une nouvelle Ligne directrice OCDE sur la phototoxicité, le groupe d'experts sur la phototoxicité a effectué une évaluation ad hoc des données de pré-validation, conjointement avec la littérature disponible , sur la capacité des modèles 3D d'épiderme humain reconstruit à prédire le potentiel phototoxique aigue in vitro. A partir d'une revue de la littérature, une base de données de 60 produits chimiques testés au moyen du modèle de peau EpiDerm™ a été construite. Les données agrégées ont défini des valeurs de spécificité et sensibilité supérieures à celles obtenues lors de l'étude de prévalidation (4), cela est dû aux instructions erronées sur l'utilisation du véhicule lors de la prévalidation (10). Il est à noter que d'autres études effectuées après la prévalidation, bien qu'utilisant les mêmes procédures standards, n'ont pas constitué une étude formelle de validation.

6. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice figurent à l'Annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. Les études ont montré que de nombreux types de produits chimiques ont des effets phototoxiques (13)(14)(15)(16). Tous ces produits ont en commun de pouvoir absorber l'énergie lumineuse dans le spectre solaire. La photoréaction nécessitant l'absorption d'un nombre suffisant de photons, il convient, avant d'envisager un essai, de déterminer le spectre d'absorption ultraviolet-visible du produit chimique d'essai, conformément à la Ligne directrice 101 de l'OCDE sur le spectre d'absorption UV-VIS (17). Il a été observé que, si le coefficient d'absorption molaire (aussi appelé coefficient d'extinction molaire) mesuré dans le méthanol est inférieur à 1000 litres × mol^{-1} × cm^{-1}, il est peu probable que le produit chimique soit photoréactif (18)(19). Il est alors inutile de le soumettre à l'essai *in vitro* de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué ou à tout autre essai biologique destiné à détecter des effets photochimiques indésirables (3)(20). En général, ce principe s'applique à tous les produits chimiques d'essai, cependant, en fonction de l'utilisation du produit chimique attendue ou des possibles conditions d'exposition, des lignes directrices plus spécifiques peuvent être indiquées. La méthode d'essai de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué peut être utilisée seule ou dans le cadre d'une stratégie à plusieurs niveaux visant à évaluer des produits chimiques appliqués localement conformément à des lignes directrices spécifiques (par exemple, la ligne directrice S10 de l'ICH pour les produits pharmaceutiques). Dans la

© OCDE (2023)

présente Ligne directrice, le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est testé, et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode d'essai de phototoxicité sur épiderme humain reconstruit aux substances et/ou aux mélanges. Des informations limitées sont disponibles sur l'applicabilité et la performance de la méthode d'esai aux mélanges de composition connue. Avant d'appliquer la Ligne directrice à des mélanges, à des produits chimiques et substances difficile à tester (parce qu'instables, par exemple) ou à des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette Ligne directrice, il convient donc d'examiner si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables.

8. La fiabilité et la pertinence de la méthode d'essai *in vitro* de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué ont été évaluées dans de multiples études (3) (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10). Les procédures et le modèle prédictif présentés dans cette Ligne directrice visent à distinguer les produits phototoxiques des produits non phototoxiques. On trouvera dans la littérature d'autres procédures et modèles prédictifs spécifiquement destinés à évaluer le pouvoir phototoxique de composés ou de mélanges appliqués localement. L'essai dont il est question ici n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets indésirables susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocancérogénicité. Il n'a pas non plus vocation à prendre en compte les mécanismes indirects de la phototoxicité, les effets des métabolites du produit chimique d'essai, ou le potentiel de phototoxicité individuel des substances qui composent les mélanges.

9. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un système d'activation métabolique dans le cadre de la méthode d'essai *in vitro* de phototoxicité sur EhR, même si les tissus épidermiques humains reconstitués ont bien une faible activité métabolique (21), car, jusqu'à présent, on ne dispose pas de preuves indiquant que des produits phototoxiques passeraient inaperçus en l'absence d'activation métabolique (22).

10. Les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le précipité bleu de formazan produit du MTT (produits chimiques colorés) et les produits chimiques d'essai pouvant directement réduire le colorant vital MTT (en formazan) peuvent interférer avec les mesures de la viabilité tissulaire s'ils persistent dans ou sur le système d'essai au moment de l'évaluation de la viabilité, et peuvent donc nécessiter l'utilisation de témoins adaptés permettant de corriger l'essai en conséquence (voir paragraphes 59-66, section « *Corrections pour la réduction du MTT et pour les interférences de couleur* »). De manière alternative, la procédure de spectrophotométrie HPLC/UPLC pour mesurer le MTT formazan peut être utilisée (voir paragraphes 65-66).

11. Si la plupart des essais de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué ont jusqu'à présent utilisé les domaines UVA-visible du spectre solaire, certaines études confirment que les tissus EhR tolèrent aussi l'exposition aux UVB (5)(23)(24) dans certaines conditions contrôlées. C'est un avantage par rapport à la plupart des essais utilisant des lignées cellulaires (LD 432 de l'OCDE) (2) qui ne tolèrent pas bien les UVB (25).

12. Une seule épreuve devrait suffire pour tester les produits chimiques dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats, une deuxième épreuve doit être envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières. Lorsqu'on procédera à ces nouvelles épreuves, il conviendra, le cas échéant, d'ajuster les concentrations des produits chimiques d'essai pour mieux caractériser la gamme des réponses à proximité de la ou des concentrations donnant des résultats ambigus (voir Interprétation des résultats et Modèle de prédiction pour plus de détails).

13. On détermine le potentiel phototoxique d'un produit chimique d'essai en appliquant plusieurs concentrations du produit aux tissus épidermiques humains reconstitués, en présence et en l'absence de lumière solaire simulée. Il suffit généralement de tester trois à cinq concentrations effectuées en deux réplicats pour obtenir des résultats d'essai acceptables avec au moins une des concentrations du produit

© OCDE (2023)

chimique d'essai et, ainsi, faire une prédiction valide. Des critères spécifiques de validité de l'essai sont présentés avec le modèle de prédiction.

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'essai de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué consiste à évaluer le potentiel phototoxique d'un produit chimique d'essai en calculant la réduction relative de la viabilité des tissus épidermiques humains reconstitués exposés à ce produit, c'est-à-dire le rapport entre les viabilités des tissus exposés à ce produit en présence d'une dose non cytotoxique de lumière solaire simulée et en l'absence de cette lumière.

15. Le produit chimique d'essai est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel de tissu épidermique humain reconstitué, composé de kératinocytes prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un *stratum corneum* multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, analogues à celles que l'on observe *in vivo*. Les tissus épidermiques humains reconstitués conviennent donc idéalement à la modélisation directe d'une exposition de la peau à des produits chimiques *in vivo* : ils ont été validés pour la prédiction des potentiels d'irritation et de corrosion cutanée de produits formulés et d'autres mélanges non dilués (1)(26).

16. Le principe général est de préparer plusieurs concentrations d'un produit chimique d'essai dans un véhicule et de les appliquer localement sur des tissus épidermiques humains reconstitués avant incubation dans les conditions de culture normalisées (37 ± 1 °C, sous CO_2 5 ± 1 %, HR 90 ± 10 %) pendant 18 à 24 heures pour permettre la pénétration dans le tissu vivant. Il suffit généralement de tester trois à cinq concentrations pour obtenir des résultats remplissant les critères de validité de l'essai à au moins une concentration. Un témoin positif et un témoin véhicule adéquats sont également appliqués localement sur les tissus épidermiques humains reconstitués et testés en parallèle. Dans chaque groupe de traitement, la moitié des tissus est exposée à la lumière simulée (+Irr) à raison de 6 J/cm^2 tandis que la moitié restante est conservée à température ambiante dans l'obscurité (−Irr) (voir paragraphes 37 et 38 pour plus de détails). Après l'exposition puis une période d'incubation de 18 à 24 heures, on détermine la viabilité relative du groupe exposé à la lumière (+Irr) et du groupe non exposé (−Irr) en mesurant la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; bromure de tétrazolium bleu de thiazolyle ; n° CAS 298-93-1] en un précipité bleu de formazan, autrement dit en mesurant la présence du formazan par photométrie après son extraction des tissus.

17. On détermine le potentiel phototoxique en comparant la réduction relative de la viabilité dans chaque échantillon exposé à la lumière à celle observée dans les échantillons non exposés équivalents.

18. Le protocole expérimental s'appuie sur l'étude de pré-validation réalisée par le ZEBET (4)(27) ; il a aussi fait l'objet d'études de suivi. Il est ressorti de ces études de suivi qu'il convenait d'apporter des modifications mineures pour améliorer la reproductibilité et la sensibilité de l'essai. Le protocole mis à jour a été publié en 2017 (10). La procédure décrite dans la présente Ligne directrice est basée sur le protocole mis à jour.

19. La présente méthode d'essai peut être utilisée seule pour vérifier la phototoxicité, notamment en cas de faible solubilité du produit chimique d'essai ou de problèmes de compatibilité avec les critères prévus dans l'essai de phototoxicité 3T3 (LD 432 de l'OCDE) et l'essai de photoréactivité DRO (LD 495 de l'OCDE). Elle peut aussi être couplée aux LD 432 et/ou 495 de l'OCDE dans le cadre d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux (8)(11)(22)(29).

© OCDE (2023)

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

20. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en classant correctement les six substances d'épreuve de compétence listées dans le **Tableau 1**. Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou lorsque d'autres raisons justifient de ne pas l'utiliser, il est possible d'en utiliser un autre pour lequel on dispose de données de référence *in vivo* et *in vitro* appropriées (par exemple, l'un de ceux de la liste des produits chimiques de référence (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10), dans la mesure où les critères appliqués sont les mêmes que ceux qui figurent dans le tableau 1. Il convient de toujours justifier l'utilisation d'une substance d'épreuve alternative.

21. Si les utilisateurs n'ont jamais utilisé le modèle d'épiderme humain reconstitué dans le laboratoire d'essai, il leur est recommandé, aux fins de la démonstration des compétences, de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Toutefois, dès lors que la méthode d'essai a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré qu'il en a la maîtrise, il n'est plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification.

Tableau 1. Substances d'épreuve de compétence[1]

	Substance	N° CAS	In vivo[2]	Véhicule[3]	Plage type de phototoxicité [% m/v ou % v/v] (références bibliographiques)
SUBSTANCES PHOTOTOXIQUES					
1	Chlorpromazine	69-09-0	PT	Eau	0.003 % – 0.01 % (4)
2	Anthracène	120-12-7	PT	EtOH[4]	0.01 % – 0.03 % (5)(30)
3	Huile essentielle de bergamote[6]	8007-75-8	PT	Huile[5]	0.0316 % – 3.16 %[6] (4)(8)
SUBSTANCES NON PHOTOTOXIQUES					
4	Dodécylsulfate de sodium	151-21-3	NPT	Eau	Non phototoxique jusqu'à la concentration testée la plus forte (1 %) (4)
5	Octyle salicylate	118-60-5	NPT	Huile[5]	Non phototoxique jusqu'à la concentration testée la plus forte (10 %) (4)
6	Acide 4-aminobenzoïque (PABA)	150-13-0	NPT	Huile[5] ou EtOH[4]	Non phototoxique jusqu'à la concentration testée la plus forte (10 %) (27)(30)

Notes : [1] Ces substances d'épreuve de compétence, qui constituent un sous-ensemble des substances utilisées dans l'étude de pré-validation et dans les études de suivi, ont été retenues sur la base des critères suivants : (i) elles sont disponibles dans le commerce, (ii) elles sont représentatives de la gamme complète des effets phototoxiques (de non phototoxique à fortement photo-irritant), (iii) elles ont une structure chimique bien définie, (iv) elles sont représentatives des fonctions chimiques utilisées dans le processus de validation, (v) elles ont donné des résultats *in vitro* reproductibles au cours de multiples essais dans de multiples laboratoires, (vi) on peut correctement prédire les résultats *in vitro* qu'elles donnent, (vii) elles ne sont pas associées à un profil extrêmement toxique (par exemple cancérogène ou toxique pour la reproduction) ni à des coûts de recyclage prohibitifs, et (viii) les résultats qui les concernent et le protocole détaillé sont disponibles dans la littérature.

[2] PT – Phototoxique ; NPT – Non phototoxique (Note : les classifications in vivo ont été dérivées à partir des études de validation du 3T3 NRU PT test (LD 432 de l'OCDE) et étaient principalement fondées sur des données humaines cliniques car aucune méthode in vivo n'est établie pour cet effet).

© OCDE (2023)

[3] Les véhicules sont suggérés sur la base des références fournies dans l'étude de pré-validation et dans les études de suivi.
[4] EtOH – Éthanol
[5] Huile – Huile de graines de sésame
[6] La présence d'impuretés peut générer des variations dans la réaction phototoxique ; il est donc conseillé d'utiliser une huile de bergamote non-purifiée, disponible dans le commerce, pour cette raison. Les huiles de bergamote non purifiées absorbe de façon significative dans les parties UVA et les UVB du spectre (8).

PROCÉDURE

22. Cette section décrit les éléments et la procédure de la méthode d'essai de phototoxicité sur épiderme humain reconstitué. Un mode opératoire standardisé pour les tests basés sur l'épiderme humain reconstruit, qui soit en conformité avec la présente Ligne directrice, est disponible (27). Le mode opératoire, comportant des améliorations techniques mineures, un guide sur la solubilité, des recommandations pour les véhicules et des informations sur les produits chimiques testés au moyen du protocole EpiDerm™ ont été publiés en 2017 (10). Le mode opératoire pour les tests sur épiderme humain reconstruit conforme à la présente Ligne directrice doit être appliqué dans la mise en œuvre de l'essai au laboratoire.

Caractérisation générale du système d'essai

23. L'épiderme est reconstruit à partir de kératinocytes humains. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) doivent être présentes sous un *stratum corneum* fonctionnel. Le *stratum corneum* doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des marqueurs de cytotoxicité tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton® X-100. Le modèle d'épiderme humain reconstitué doit présenter des propriétés de confinement telles qu'aucune matière ne puisse contourner le *stratum corneum* pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, il doit être exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

24. Le test utilisé pour quantifier la viabilité est le test MTT (31). Les cellules viables de l'épiderme humain reconstitué peuvent réduire le colorant vital MTT en un précipité bleu de formazan qui est alors extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou un véhicule analogue). L'absorbance (également appelée densité optique ou DO) du véhicule d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieure à 0.1. Le formazan extrait peut être quantifié soit par mesure standard de l'absorbance (DO), soit par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (32). Les développeurs/fournisseurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent faire en sorte que chaque lot satisfasse aux critères de qualité définis pour les témoins négatifs (TN). La plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure de DO) (dans les conditions décrites au paragraphe 56) applicable au témoin négatif qu'ils ont établie est présentée au **Tableau 2**. Les utilisateurs du modèle doivent s'assurer que les résultats obtenus avec les témoins véhicule (c.-à-d. témoins négatifs) remplissent les critères spécifiques d'acceptabilité de la méthode d'essai. Quand la CLHP/CLUP-spectrophotométrie est utilisée, les valeurs de la plage d'acceptabilité applicable au témoin négatif fournie au **Tableau 2** doivent être utilisées comme critère d'acceptabilité du témoin véhicule (négatif).

© OCDE (2023)

Tableau 2. Plages d'acceptabilité de la DO du témoin véhicule (négatif) pour le test MTT inclus dans cette ligne directrice

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiDerm™ (EPI-200)	0.8	2.8

Fonction barrière

25. Les développeurs/fournisseurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent faire en sorte que chaque lot satisfasse aux critères de qualité définis pour les témoins négatifs (TN). La fonction barrière peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance de référence (p. ex. dodécylsulfate de sodium (SDS) ou Triton® X-100) réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI_{50}) après un temps d'exposition donné, soit en déterminant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE_{50}) après application de la substance de référence à une concentration fixe donnée. Les plages d'acceptabilité applicables à la méthode d'essai de la présente Ligne directrice sont indiquées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Critères de contrôle de qualité des lots relatifs à la fonction barrière des modèles d'épiderme humain reconstitué compris dans la présente LD

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiDerm™ (EPI-200)	ET_{50} = 4.00 h	ET_{50} = 8.72 h

Morphologie

26. Les développeurs/fournisseurs du modèle d'épiderme humain reconstitué peuvent fournir un examen histologique apportant la preuve que leur modèle a une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche) si ce paramètre fait partie de la procédure de contrôle de qualité du modèle.

Reproductibilité

27. Les développeurs/fournisseurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent conserver dans une base de données les résultats des contrôles de qualité effectués pour vérifier la viabilité et la fonction barrière, afin d'en surveiller la reproductibilité au fil du temps. Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué ont quant à eux pour recommandation de constituer une base des résultats des essais de phototoxicité effectués avec les témoins positif et véhicule (négatif), afin de confirmer la reproductibilité de la méthode d'essai au fil du temps.

Contrôle de qualité

28. Un modèle d'épiderme humain reconstitué ne peut être utilisé dans le cadre de cette méthode que si ses développeurs/fournisseurs ont donné la preuve que chaque lot répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 24), à la fonction barrière (paragraphe 25) et, le cas échéant, à la morphologie (paragraphe 26). Les informations de contrôle de

© OCDE (2023)

qualité correspondantes sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Seuls les résultats d'essais de phototoxicité conduits sur des tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets phototoxiques des produits chimiques d'essai.

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

29. Les produits chimiques d'essai doivent être fraîchement préparés, le jour de leur utilisation, à moins que des données n'établissent leur stabilité au stockage. Il est recommandé de procéder à la manipulation des produits chimiques et au traitement initial des tissus dans des conditions d'éclairage permettant d'éviter la photoactivation ou la dégradation du produit chimique d'essai avant exposition à la lumière. Les produits chimiques d'essai pouvant absorber et filtrer les UV, leur concentration maximale recommandée ne doit pas dépasser 10 % (10)(27).

30. Il suffit généralement de tester trois à cinq concentrations du produit chimique d'essai dans un véhicule pour obtenir, à au moins une concentration, des résultats d'essai acceptables, conformes aux exigences et permettant d'évaluer le potentiel phototoxique du produit chimique d'essai (voir paragraphes 69-71). Dans l'idéal, il s'agira de choisir des concentrations du produit chimique d'essai permettant d'obtenir une courbe dose-réponse de cytotoxicité en l'absence d'exposition à la lumière. On trouvera dans les modes opératoires normalisés des recommandations pour sélectionner les bonnes plages de concentration (10)(27).

31. Les produits chimiques d'essai hydrosolubles sont préparés dans de l'eau ultra pure ou, si applicable, dans une solution saline tamponnée telle que la solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS) ou la solution saline équilibrée de Hank (HBSS) sans rouge de phénol. La solution tamponnée utilisée doit être exempte d'éléments protéiques ou qui absorbent la lumière (p. ex., indicateurs de pH tels que le rouge de phénol, ou vitamines), afin d'éviter les interférences lors de l'exposition à la lumière.

32. Les produits chimiques d'essai liposolubles sont préparés dans de l'huile de sésame ou dans une autre huile adaptée telle qu'une huile minérale présentant une faible absorption des UV et dont la compatibilité avec l'épiderme humain reconstitué a été démontrée. Dans le cas des produits chimiques d'essai faiblement solubles dans l'eau et dans l'huile, il est possible d'utiliser l'éthanol pur ou un mélange acétone:huile d'olive (4:1 v:v) (10).

33. Il est envisageable d'utiliser d'autres véhicules, à condition d'évaluer préalablement leurs propriétés spécifiques, notamment leur compatibilité avec l'épiderme humain reconstitué, les risques de réaction avec le produit chimique d'essai, leur effet phototoxique, leur potentiel d'atténuation d'un effet phototoxique, les propriétés de fixation des radicaux, et/ou la stabilité du produit chimique dans ce véhicule (33). Lorsque des véhicules alternatifs sont utilisés, il est recommandé de les tester préalablement pour vérifier leur stabilité et leur compatibilité avec le système d'essai (voir les recommandations supplémentaires à l'Annexe 3).

34. Si nécessaire, il est possible de recourir à un mélangeur Vortex, à la sonication et/ou à un chauffage à des températures appropriées pour faciliter la solubilisation, à moins qu'une telle manipulation n'affecte la stabilité du produit chimique d'essai. Les procédures employées pour préparer les dilutions des produits chimiques d'essai doivent figurer dans le rapport.

35. Avant de procéder à l'essai sur les tissus épidermiques humains reconstitués viables, il est recommandé d'évaluer le risque d'interférence du produit chimique d'essai avec le résultat mesuré (test MTT). Les procédures correspondantes sont décrites en détail dans les modes opératoires normalisés. En cas de risque d'interférence du produit chimique d'essai avec le test MTT, il est recommandé de recourir aux témoins adaptés décrits dans la section *« Corrections pour la réduction du MTT et pour les interférences de couleur* ».

© OCDE (2023)

36. Il convient de tester un témoin véhicule (utilisé comme témoin négatif) et un témoin positif en parallèle dans chaque épreuve. Il est suggéré d'utiliser comme témoin véhicule de l'eau (pour les produits chimiques hydrosolubles), de l'huile de sésame (pour les produits chimiques liposolubles), et/ou tout autre véhicule utilisé pour solubiliser le produit chimique d'essai. Il est suggéré d'utiliser comme témoin positif la chlorpromazine à une concentration finale comprise entre 0.01 % et 0.02 % dans l'eau ou dans d'autres solutions salines tamponnées telles que le DPBS ou le HBSS sans rouge de phénol. Aux fins de la démonstration des compétences, on pourra tester des concentrations supplémentaires pour évaluer la courbe dose-réponse de la chlorpromazine avant de réaliser l'essai (4)(10)(27).

Conditions d'exposition à la lumière

37. *Sources de lumière :* le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés (simulateur solaire, par exemple) est un facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et du visible sont généralement associés à des réactions phototoxiques *in vivo* (15)(28), tandis que les UVB sont moins pertinents, mais très cytotoxiques, avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1000 entre 313 et 280 nm (28). Les sources de lumière acceptables émettent dans la totalité du spectre solaire (de 290 nm à 700 nm). Il est possible d'ajuster ce spectre à l'aide de filtres pour atténuer les UVB tout en laissant passer les UVA et la lumière visible (voir Annexe 2). En outre, les longueurs d'onde, les doses employées et la source de lumière (appareil ouvert ou fermé, par exemple) ne doivent pas endommager le système d'essai (à cause d'une émission de chaleur ou de longueurs d'onde dans l'infrarouge, par exemple).

38. La lumière solaire simulée par des simulateurs solaires est considérée comme la source préférée de lumière artificielle. L'irradiance spectrale en sortie du simulateur solaire et du filtre doit être proche de celle de la lumière du jour extérieure (34). Il est possible d'utiliser comme simulateurs solaires des lampes à arc au xénon ou des lampes à arc aux halogénures métalliques-mercure (dopées) (30). Ces dernières ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chères, mais elles reproduisent moins bien la lumière solaire que les arcs au xénon. Dans la mesure où tous les simulateurs solaires émettent d'importantes quantités d'UVB, ils doivent être équipés de filtres adéquats pour atténuer ces longueurs d'onde (voir Annexe 2). De plus, comme les matériaux plastiques utilisés pour les cultures cellulaires contiennent des stabilisateurs UV, le spectre transmis doit être mesuré à travers le même type de couvercle de plaques que celui employé dans l'essai. Abstraction faite des mesures prises pour atténuer une part du spectre par filtration, ou des effets de filtre inévitables liés aux appareils, le spectre enregistré sous ces filtres ne doit pas dévier de la norme de lumière du jour extérieure (34). La norme d'émission internationalement reconnue pour la lumière du jour extérieure est l'éclairage normalisé D65, dont la définition figure dans le document ISO/DIS 18909:2006. On trouvera dans les documents (10), (30) et (23) un exemple de distribution d'irradiance spectrale du rayonnement filtré émis par le simulateur solaire utilisé dans l'étude de pré-validation et dans les études de suivi conduites avec le modèle EpiDerm™. Consulter aussi la figure 1 de l'Annexe 2.

39. *Dosimétrie* : l'irradiance (éclairement énergétique) doit être régulièrement contrôlée avant chaque essai de phototoxicité, à l'aide d'un radiomètre UVA étalonné à large bande approprié. Il convient de la mesurer à travers le même type de couvercle de plaques que celui employé dans l'essai.

40. Il a été déterminé qu'une dose d'environ 6 J/cm^2 (dans la plage des UVA) est non-cytotoxique pour les tissus épidermiques humains reconstitués et suffisamment puissante pour exciter les produits chimiques et déclencher des réactions phototoxiques (4)(10)(30). Pour obtenir 6 J/cm^2 dans un délai de 60 minutes, on a choisi une irradiance de 1.7 mW/cm^2 de lumière UVA-visible (voir le graphique 2 de

© OCDE (2023)

l'Annexe 2). Il est possible d'obtenir 6 J/cm^2 avec d'autres durées d'exposition et/ou niveaux d'irradiance, conformément à la formule ci-dessous :

$$t\ (\text{min}) = \frac{\text{dose d'exposition à la lumière } (\text{J/cm}^2) \times 1000}{\text{irradiance } (\text{mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

41. Le modèle de tissu épidermique humain reconstitué résiste aux UVB (5)(23)(24) ; il peut donc être pertinent dans certains cas de l'exposer aux UVB, par exemple lorsque l'absorption du produit chimique d'essai se situe exclusivement dans ce domaine du spectre. L'inclusion des UVB dans le spectre utilisé doit être contrôlée et mentionnée dans le rapport final, de même que tout changement de l'irradiance.

42. De même, en cas d'utilisation d'une autre source de lumière, il peut être nécessaire d'ajuster la dose de lumière de telle sorte qu'elle soit suffisante pour activer les phototoxines standard, sans être nocive pour les cellules. Il convient de réaliser une vérification fonctionnelle en testant les substances d'épreuve figurant au Tableau 1 ainsi que dans le graphique 2.

43. *Sensibilité des cellules à l'exposition à la lumière :* la sensibilité aux UVA doit être testée lorsque l'essai est mis en place pour la première fois dans un laboratoire. Les modes opératoires normalisés fournissent une description succincte de la méthode et des résultats attendus. La viabilité des tissus exposés à 6 J/cm^2 de lumière doit être ≥ 80 % de la viabilité des tissus maintenus dans l'obscurité.

Mode opératoire

44. *Préparation des tissus :* à réception des tissus épidermiques humains reconstitués, vérifier l'intégrité de tous les éléments du kit. Dans un environnement stérile, transférer les tissus dans des plaques 6 puits contenant 0.9 mL de milieu de culture par puits. Incuber les plaques dans les conditions de culture normalisées (37 ± 1 °C, sous CO_2 5 ± 1 %, HR 90 ± 10 %) pendant 60 minutes au moins. La pré-incubation peut durer toute la nuit, cependant le milieu de culture doit être changé après les premières 60 minutes.

45. Après au minimum 60 minutes de pré-incubation, sortir la plaque 6 puits de l'incubateur et remplacer le milieu sous les tissus par un milieu frais préchauffé à 37 ºC. L'essai peut être réalisé de suite ou plus tard, auquel cas les tissus sont remis dans l'incubateur jusqu'à l'application du traitement. Pour chaque traitement ou groupe de traitement, traiter quatre tissus de manière à ce que deux servent à la partie cytotoxicité de l'essai (traitement en l'absence de lumière) et deux autres servent à la partie phototoxicité de l'essai (traitement en présence de lumière).

46. *Application des doses* : les tissus épidermiques humains reconstitués sont traités localement. Si la dilution a été effectuée dans l'eau ou dans un tampon aqueux, appliquer localement 50 µL de solution diluée sur l'épiderme humain reconstitué et étaler délicatement, si nécessaire, à l'aide d'une pipette pasteur stérile dont une extrémité a été fondue pour obtenir un bout rond, ou avec un autre ustensile similaire. Si la dilution a été effectuée dans l'huile, appliquer localement 25 µL de solution diluée sur l'épiderme humain reconstitué et étaler délicatement, si nécessaire, à l'aide d'une pipette pasteur stérile à bout rond (comme ci-dessus). Un disque de membrane en nylon stérile peut être utilisé pour faciliter l'étalement sur les tissus, si nécessaire (par capillarité, la solution viendra recouvrir les tissus). Si un véhicule est susceptible d'irriter la peau, réduire le volume de solution pour limiter le risque de cytotoxicité liée au véhicule. Par exemple, ne pas appliquer plus de 20 à 25 µL de solutions diluées dans l'éthanol ou dans un mélange acétone:huile d'olive (4:1), car une cytotoxicité peut apparaître à des volumes supérieurs.

47. Une fois les tissus mis en contact avec les solutions diluées, les remettre dans l'incubateur pendant 18 à 24 heures dans les conditions de culture normalisées.

© OCDE (2023)

48. Le lendemain, transférer les tissus dans une nouvelle plaque 6 puits pré-remplie avec 0.9 mL de solution tamponnée (p. ex., DPBS ou HBSS sans rouge de phénol) ou dans une plaque 24 puits pré-remplie avec 0.3 mL de solution tamponnée. Il est recommandé d'utiliser une solution saline tamponnée sans rouge de phénol, car l'exposition de ce composé à la lumière dans le milieu de culture cellulaire peut augmenter la variabilité et la production de photoproduits cytotoxiques (35).

49. *Exposition à la lumière* : exposer les plaques +Irr (avec leur couvercle) à 1.7 mW/cm^2 pendant 60 minutes (ou l'équivalent) à température ambiante, pour atteindre une exposition totale à la lumière simulée de 6 J/cm^2. Si la source de lumière génère trop de chaleur et cause de la condensation sur le couvercle, rafraîchir les plaques à l'aide d'un ventilateur. Placer les plaques -Irr dans l'obscurité à température ambiante, par exemple dans une boîte, de préférence dans la même pièce que les tissus exposés à la lumière. Si un voile a été utilisé pendant le traitement il faudra veiller à retirer le voile avec précaution (par exemple au moyen de forceps fins) avant l'exposition à la lumière/à l'obscurité. Préparer de nouvelles plaques 6 puits contenant chacun 0.9 mL de milieu de culture frais préchauffé à 37 ºC.

50. À la fin de la période d'exposition à la lumière, rincer chaque tissu avec du CMF-DPBS stérile contenu dans une pissette. Pour enlever efficacement les produits chimiques d'essai de la surface des tissus, il faut procéder à environ 20 lavages avec une pissette. La procédure utilisée pour retirer les dilutions du traitement doivent être consignées dans le rapport final. Transférer tous les tissus dans les nouvelles plaques qui contiennent un milieu frais. Sécher soigneusement la surface de chaque tissu à l'aide de cotons-tiges stériles.

51. Dans le cas où les caractéristiques du produit chimique testé peuvent gêner ou bloquer son exposition à la lumière (p. ex. une coloration sombre ou des composés opaques), les dilutions de traitement doivent être retirées avant l'exposition à la lumière ou le maintien dans l'obscurité, Dans ces conditions d'essai, le produit chimique testé qui s'infiltre dans l'épiderme humain reconstruit pendant les 18 à 24h de l'exposition, est biodisponible dans les tissus au moment de l'exposition à la lumière. La période des 18 à 24h de traitement préalable à l'exposition à la lumière est bien plus longue que la période de traitement appliquée dans le test d'irritation de la Ligne directrice 439 (1), and permet donc un temps suffisamment long pour que le produit chimique pénètre effectivement dans les tissus proche des cellules ciblées où les espèces phototoxiques réactives peuvent être induites lors de l'exposition à la lumière. Des gazes de coton stériles trempées dans le milieu de rinçage (p.ex. DPBS sans Ca^{++} et Mg^{++} (CMF-DPBS)) peuvent être utilisées pour enlever le produits chimique testé avant l'exposition à la lumière visible/UVA ou le maintien dans l'obscurité. Il faudra justifier le retrait du produit chimique testé avant l'exposition à la lumière.

52. Incuber les tissus pendant 18 à 24 heures dans les conditions de culture normalisées.

53. *Test MTT de viabilité* : préparer une solution de MTT à 1 mg/mL, la préchauffer à 37 ºC, et en ajouter 300 µL dans les puits adaptés de plaques 24 puits étiquetées. Après l'incubation de 18 à 24 heures, extraire les tissus des plaques 6 puits, essuyer le fond des tissus sur une gaze ou un mouchoir de papier stériles, puis les transférer dans les puits appropriés des plaques 24 puits étiquetées contenant du MTT. Incuber les plaques 24 puits pendant trois heures dans les conditions de culture normalisées.

54. Après l'incubation en présence de MTT, extraire les tissus des plaques, essuyer le fond des tissus sur une gaze ou un mouchoir de papier stériles, puis les transférer dans les puits appropriés de nouvelles plaques 24 puits étiquetées. Extraire les tissus dans 2 mL d'isopropanol (solution d'extraction). Sceller les plaques 24 puits, par exemple avec du Parafilm, et les placer pendant au moins deux heures à température ambiante sur un agitateur de plaques à faible vitesse, afin d'extraire le formazan. L'extraction peut aussi avoir lieu pendant toute une nuit. Dans ce cas, sceller les plaques comme décrit précédemment et effectuer l'extraction à température ambiante, dans l'obscurité et sans agitation. Avant de prélever des échantillons, procéder à 15 minutes d'agitation sur un agitateur de plaques.

© OCDE (2023)

55. Quand l'extraction est terminée, au choix, retirer les tissus des puits et laisser décanter la solution d'extraction dans les puits, ou bien, percer les tissus (par exemple, à l'aide d'une aiguille de calibre 20) et laisser la solution d'extraction se vider dans le puits avant de retirer le tissu (lequel peut être éliminé). Mélanger l'extrait obtenu à la pipette au moins trois fois, jusqu'à l'obtention d'une solution d'extraction homogène. Pour chaque tissu, introduire à la pipette des aliquotes de 200 µL de la solution d'extraction dans les puits d'une plaque microtitre 96 puits à fond plat étiquetée. Pour finir, ajouter 200 µL d'isopropanol dans les puits attribués aux blancs.

56. Déterminer l'absorbance (DO) dans la plaque 96 puits à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaque microtitre, à une longueur d'onde comprise entre 540 et 595 nm, de préférence à 570 nm (avec un filtre passe-bande de ± 30 nm maximum). Il n'est pas nécessaire d'effectuer une mesure avec un filtre de référence. Une autre solution consiste à déterminer l'absorbance des échantillons de formazan par CLHP/CLUP-spectrophotométrie ([1]).

Calcul de la viabilité cellulaire

57. *Calcul de la viabilité.* La valeur de DO obtenue pour chaque produit chimique d'essai peut être utilisée pour calculer la viabilité relative, c'est-à-dire le rapport exprimé en pourcentage entre la viabilité cellulaire en présence du produit chimique d'essai et la viabilité cellulaire en présence du témoin véhicule (négatif). Si l'on procède par CLHP/CLUP-spectrophotométrie, la viabilité relative est le rapport exprimé en pourcentage entre l'aire du pic de formazan obtenu avec les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai et l'aire du pic de formazan obtenu avec le témoin véhicule (négatif) testé simultanément.

58. Cette viabilité relative (ou « pourcentage du témoin ») est calculée, pour chaque produit chimique d'essai ou témoin positif appliqué aux tissus +Irr, par rapport à la moyenne des valeurs obtenues pour les tissus +Irr traités avec le témoin véhicule (négatif). De la même façon, elle est calculée, pour chaque produit chimique d'essai ou témoin positif appliqué aux tissus -Irr, par rapport à la moyenne des valeurs obtenues pour les tissus -Irr traités avec le témoin véhicule (négatif). On fait ensuite la moyenne de toutes ces viabilités relatives pour obtenir la viabilité relative moyenne ou « moyenne du pourcentage du témoin » pour chaque concentration, et pour chaque situation d'exposition (+Irr ou -Irr). Pour cela, on applique la formule suivante :

$$\%\ du\ témoin\ = \frac{\text{DO corrigée pour chaque produit chimique d'essai ou témoin positif}}{\text{DO corrigée pour témoin négatif/véhicule}} \times 100$$

Corrections pour la réduction du MTT et pour les interférences de couleur

59. Les propriétés optiques du produit chimique d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité (par exemple, si le produit chimique peut aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer). Cela peut se produire lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement rincé ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme. Si un produit chimique d'essai agit directement sur le MTT (p. ex. un agent réducteur du MTT), s'il est naturellement coloré, ou s'il se colore durant le traitement du tissu, il est nécessaire d'utiliser des témoins supplémentaires pour détecter et corriger les interférences du produit chimique d'essai avec la mesure de la viabilité. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans les modes opératoires normalisés des méthodes d'essai validées de l'OCDE destinées à détecter les effets corrosifs ou irritants sur la peau et les yeux (5)(25).

© OCDE (2023)

60. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai (à la plus haute concentration testée) à un milieu MTT fraîchement préparé. Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur des modèles d'épiderme humain reconstitué non viables, que la méthode choisie soit la mesure standard de l'absorbance (DO) ou la CLHP/CLUP-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Chaque produit chimique d'essai réducteur direct du MTT est appliqué, à la concentration d'essai la plus forte, à au moins deux réplicats de tissus tués (c.-à-d. un tissu qui sera exposé à la lumière et un tissu qui sera maintenu dans l'obscurité), lesquels sont alors soumis à l'ensemble du protocole d'essai pour générer une réduction non spécifique du MTT (MTT NS).

61. Un seul témoin MTT NS par produit chimique d'essai suffit, quel que soit le nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est obtenue comme suit : on calcule la différence entre le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT et le pourcentage de réduction du MTT non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT, puis on exprime cette différence en proportion du témoin véhicule (négatif) testé en parallèle de l'essai à corriger (%MTT NS).

62. Pour repérer les interférences potentielles causées par des produits chimiques d'essai colorés ou qui deviennent colorés au contact de l'eau ou de l'isopropanol, et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, on réalise une analyse des produits chimiques d'essai dans l'eau (environnement au moment de l'exposition) et/ou dans l'isopropanol (véhicule d'extraction). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou l'isopropanol absorbe la lumière dans la plage de 570 ± 30 nm, il convient de recourir à des témoins de coloration supplémentaires. Une autre solution consiste à procéder par CLHP/CLUP-spectrophotométrie, auquel cas le recours à des témoins de coloration n'est pas nécessaire.

63. Lorsque la méthode employée est la mesure standard de l'absorbance (DO), chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué, à la concentration la plus forte, sur au moins deux réplicats de tissus viables (c.-à-d. un tissu qui sera exposé à la lumière et un tissu qui sera maintenu dans l'obscurité), et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants (Tvivants NS). Le témoin Tvivants NS est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin Tvivants NS indépendant est testé en parallèle de chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme la différence entre le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés avec la solution MTT et le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger (%Tvivants NS).

64. Il importe de noter qu'une réduction du MTT non spécifique et que des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre. Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre à l'aide de formazan (n° CAS 57360-69-7) disponible dans le commerce avant de soumettre les produits chimiques à l'essai à des fins réglementaires. Les mesures standard de la DO au moyen d'un spectrophotomètre sont pertinentes pour évaluer les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés quand la DO des extraits de tissus traités par le produit chimique d'essai sans

© OCDE (2023)

correction pour la réduction directe du MTT et/ou pour les interférences de couleur sont dans la plage de linéarité du spectrophotomètre.

65. Quand des produits chimiques d'essai colorés ne sont pas compatibles avec la mesure standard de l'absorbance (DO) à cause de leur forte interférence avec le test MTT, la mesure du formazan peut être réalisée par CLHP/CLUP-spectrophotométrie. Le système de CLHP/CLUP-spectrophotométrie permet de séparer le formazan du produit chimique d'essai avant la quantification (32). Pour cette raison, les témoins Tvivants NS et Tmorts NS ne sont pas nécessaires dans le cas de la CLHP/CLUP-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique d'essai concerné. Les témoins MTT NS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT, ou que sa couleur empêche l'évaluation de son potentiel de réduction directe du MTT. Quand on utilise la CLHP/CLUP-spectrophotométrie pour quantifier le formazan, la viabilité relative est le rapport exprimé en pourcentage entre l'aire du pic de formazan obtenu avec les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai et l'aire du pic de formazan obtenu avec le témoin véhicule (négatif) testé simultanément. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit : pourcentage de viabilité tissulaire obtenu avec les tissus vivants moins %MTT NS. Pour finir, il convient de noter qu'il n'est pas possible d'évaluer les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure standard de la DO) ou à des surfaces de pic (pour la CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en-dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre ; mais un tel cas ne se présente a priori que très rarement.

66. La procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan avec tous les types de produits chimiques d'essai (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT). Étant donné la diversité des équipements de CLHP/CLUP-spectrophotométrie, il convient de démontrer l'efficacité de l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie avant de l'utiliser pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en montrant qu'il remplit les critères d'acceptation pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse.

Critères de validité de l'essai

67. Une épreuve de l'essai est valide si les critères d'acceptabilité suivants sont remplis :

- La différence de viabilité relative entre les deux réplicats de tissus traités avec le véhicule (témoin négatif) ou avec le témoin positif ne dépasse pas 20 %.
- La viabilité observée avec les témoins véhicule (négatifs) en l'absence de lumière est située dans la plage d'acceptabilité indiquée au **Tableau 2.**
- La viabilité observée dans le témoin véhicule (négatif) après exposition à la lumière est supérieure ou égale à 80 % de la viabilité observée dans le témoin véhicule (négatifs) en l'absence de lumière ; ce témoin permet de démontrer l'absence de sensibilité excessive des cellules au rayonnement, tel que décrit au paragraphe 43.
- Le témoin positif génère une prédiction positive.

68. Pour être retenu aux fins de l'évaluation du potentiel phototoxique, un groupe traité avec le produit chimique d'essai doit satisfaire au critère suivant :

© OCDE (2023)

- La viabilité des tissus traités avec le produit chimique d'essai en l'absence de lumière est suffisamment élevée (par exemple, > 35 %) pour permettre de faire des prédictions de phototoxicité ou de non-phototoxicité à la concentration maximale recommandée de 10 % (100 mg/mL) ou, lorsque la concentration maximale est limitée par une cytotoxicité, à la concentration tolérée la plus haute.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

69. Un produit chimique est considéré comme **phototoxique** ou comme ayant un potentiel phototoxique si, à une ou plusieurs concentrations d'essai, la viabilité relative moyenne après traitement en présence de lumière est inférieure de plus de 30 % à la viabilité relative moyenne après traitement en l'absence de lumière.

70. Un produit chimique est considéré comme **non phototoxique** ou comme n'ayant pas de potentiel phototoxique si aucune des viabilités relatives moyennes obtenues après traitement en présence de lumière n'est inférieure de plus de 30 % à la viabilité relative moyenne obtenue à la même concentration d'essai après traitement en l'absence de lumière.

71. Dans le cas où aucune des concentrations testées ne résulte en une prédiction de phototoxicité, et si au moins l'une des concentrations se trouve dans les 5% autour de la valeur seuil de viabilité cellulaire mentionnée ci-dessus, et/ou que des résultats non-concordants sont obtenus entre les réplicats, une deuxième expérience devrait être conduite, ainsi qu'une troisième si les deux premières ne sont pas concordantes. Le cas échéant, une plage de concentrations plus proche de la concentration à laquelle un résultat indiquant une phototoxicité potentielle a été observé devrait être testée.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

72. *Qualité et quantité des données.* Les concentrations utilisées doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-effet obtenues avec et sans exposition à la lumière. Les essais qui donnent des résultats équivoques, limites ou non clairs, doivent être vérifiés à l'aide d'épreuves supplémentaires. Dans ce cas, on envisagera de modifier les conditions expérimentales (p. ex. les concentrations testées).

73. Pour chaque épreuve, il convient de présenter les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque produit chimique d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en reproduisant les expériences. Le rapport doit aussi mentionner les moyennes de viabilité ± la différence entre les tissus dupliqués dans chaque épreuve. Il doit aussi signaler, pour chaque produit chimique d'essai, les interactions observées avec le réactif MTT et les produits chimiques d'essai colorés.

© OCDE (2023)

Rapport d'essai

74. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produits chimiques d'essai et substances témoins :

- Substance mono-constituant : identification chimique, notamment désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.
- Substance multi-constituant, UVCB ou mélange : caractérisation dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants
- Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes
- Source et numéro de lot, si disponible
- Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage)
- Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption ou date de vérification analytique, si disponible
- Conditions de stockage
- Véhicule (justification du choix du véhicule ; solubilité du produit chimique d'essai dans le véhicule)

Modèle d'épiderme humain reconstitué et protocole utilisés (avec justification de ce choix, le cas échéant) :

- Modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot)
- Informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances. Ces informations doivent prendre la forme d'un certificat d'analyse ou du rapport de contrôle de qualité émis par le développeur/fournisseur du modèle. Elles comprennent notamment les éléments suivants (liste non limitative) :
    i) viabilité
    ii) fonction barrière
    iii) morphologie
    iv) contrôles de qualité (CQ) du modèle

- Références des données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative) l'acceptabilité des données de contrôle de qualité faisant référence aux données historiques du lot
- Démonstration de la compétence à exécuter la méthode d'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence

Conditions de l'essai :

- Informations d'étalonnage de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), longueur d'onde et passe-bande (s'il y a lieu) utilisés pour quantifier le formazan, et plage de linéarité de l'appareil de mesure ; description de la méthode utilisée pour quantifier le formazan

© OCDE (2023)

- Description de la qualification du système de CLHP/CLUP-spectrophotométrie, s'il y a lieu
- Source de lumière et conditions d'exposition :
  – justification du choix de la source de lumière utilisée
  – fabricant et type de la source de lumière et du radiomètre
  – caractéristiques complètes d'irradiance spectrale de la source de lumière
  – caractéristiques de transmission/d'absorption du ou des filtres utilisés
  – caractéristiques du radiomètre et modalités d'étalonnage
  – distance entre la source de lumière et le système d'essai
  – irradiance UVA à cette distance, exprimée en mW/cm^2
  – durée d'exposition à la lumière
  – dose d'UVA (irradiance × temps), exprimée en J/cm^2
  – température appliquée aux cultures cellulaires durant l'exposition à la lumière et aux cultures cellulaires maintenues en parallèle dans l'obscurité

Mode opératoire :

- Description détaillée des procédures appliquées, y compris les procédures de lavage utilisées après la période d'exposition
- Doses de produit chimique d'essai et de substances témoins
- Justification du choix des concentrations de produit chimique d'essai utilisées en présence et en l'absence de lumière
- Type et composition du véhicule/véhicule
- Durée et température des périodes d'exposition et d'incubation post-traitement
- Indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorés, s'il y a lieu
- Nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et par témoin (témoin positif, témoin véhicule (négatif), MTT NS et Tvivants NS, le cas échéant)
- Description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé
- Description de toute modification apportée au protocole d'essai (y compris aux procédures de lavage)

Critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai :

- Critères d'acceptabilité de la variabilité entre les réplicats de tissus pour les témoins positif et véhicule (négatif)
- Critères d'acceptabilité pour les valeurs de DO du témoin véhicule (négatif)
- Critères d'acceptabilité pour la viabilité observée avec le témoin véhicule (négatif) après exposition à la lumière comparée à la viabilité observée sans exposition à la lumière
- Critères d'acceptabilité pour le témoin positif

Résultats :

- Présentation des résultats sous forme de tableau, pour chaque produit chimique d'essai, chaque épreuve et chaque réplicat, y compris la densité optique (DO) ou l'aire du pic de formazan, la viabilité tissulaire en pourcentage, la viabilité tissulaire moyenne en pourcentage et les différences entre les réplicats

© OCDE (2023)

- S'il y a lieu, résultats obtenus avec les témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorés, y compris la densité optique (DO) ou l'aire du pic de formazan, le % MTT NS, le % Tvivants NS et la viabilité relative finale corrigée
- Résultats obtenus avec le ou les produits chimiques d'essai et les substances témoins au regard des critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai
- Description des autres effets observés
- Classification obtenue compte tenu du modèle de prédiction et des critères de décision utilisés

Discussion des résultats.

Conclusions.

© OCDE (2023)

BIBLIOGRAPHIE

1) OECD. (2020). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439): In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264242845-en
2) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 432): In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264071162-en-189228)

3) Liebsch, M.,
See Last Page. Barrabas, C., Traue, D. and Spielmann, H. (1997) Development of a new in vitro test for dermal phototoxicity using a model of reconstituted human epidermis (EpiDermTM)] [Article in German], ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 14(4), pp. 165-174. doi: 10.14573/altex.1997.4.165.

4) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Gerberick, G.F., Cruse, L., Diembeck, W., Pfannenbecker, U., Spieker, J., Holzhütter, H.G., Brantom, P., Aspin, P., and Southee, J. (1999). In Alternatives to Animal Testing II: Proceedings of the second international scientific conference organised by the European Cosmetic Industry, Brussels, Belgium (ed. D. Clark, S. Lisansky & R. Macmillan), pp. 160–166. Newbury, UK: CPL Press

5) Jones, P., King, A., Lovell, W., and Earl, L. (1999) Phototoxicity testing using 3-D reconstructed human skin models. In: Clark D, Lisansky S, Macmillan R, editors. Alternatives to animal testing II: proceedings of the second international scientific conference organised by the European cosmetic Industry, Brussels, Belgium. Newbury, UK: CPL Press; 1999. p. 138–41.

6) Jirová D, Kejlová K, Bendová H, Ditrichová D, Mezulániková M (2005) Phototoxicity of bituminous tars-correspondence between results of 3T3 NRU PT, 3D skin model and experimental human data. Toxicology in Vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA. 19(7):931-934. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.013.

7) Kandarova, H. (2006). Evaluation and Validation of Reconstructed Human Skin Models as Alternatives to Animal Tests in Regulatory Toxicology - PhD Thesis. http://edocs.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002248

8) Kejlová, K., Jírová, D., Bendová, H., Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., and Liebsch, M. (2007). Phototoxicity of Bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. Toxic. in Vitro 21, p. 1298–1303

9) Kejlová K, Jírová D, Bendová H, Gajdoš P, Kolářová H. (2010) Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. Toxicol In Vitro. 24(8):2084-9. doi: 10.1016/j.tiv.2010.07.025. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20688147.

10) Kandárová,H., and Liebsch, M. (2017) The EpiDerm™ Phototoxicity Test (EpiDerm™ H3D-PT). Book Chapter In: Alternatives for Dermal Toxicity Testing, Editors: Chantra Eskes, Erwin van Vliet, Howard I. Maibach. Springer. 483-503.

© OCDE (2023)

11) Pape, Wolfgang & Balls, Michael & M., Csato & O., De & J., Dupuis & Gerberick, Frank & W.W., Lovell & Liebsch, Manfred & Pfannenbecker, Uwe & M., Potthast & Spielmann, Horst & Steiling, Winfried. (1999). A Proposed Strategy for Testing Phototoxicity by Stepwise Use of Validated In Vitro Methodolgies: The COLIPA Task Force on Phototoxicity In Vitro. COLIPA Symposium on Alternative methods 24-25 March 1999. Brussles, Belggim. Page 15-16.

12) Liebsch M. (2006) A feasibility study on whether the prevalidated human 3-D Epidermis model in vitro phototoxicity test (EpiDerm-PT), could succssfully be used for phototoxic potency testing. Interm Report. Contract No. 19868-31 pages. Available at: https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02

13) Lovell, W.W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

14) Santamaria, L., and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In “Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry” Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

15) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop. ATLA, 22, 314-348.
16) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In “The science of Photobiology” Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

17) OECD (1981). OECD Test Guideline for the Testing of Chemicals (No. 101): UV-VIS Absorption Spectra. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264069503-en

18) Bauer, D., Averett, L.A., De Smedt, A., Kleinman, M.H., Muster, W., Pettersen, B.A., and Robles, C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. Regul Toxicol Pharmacol, 68: 70-75.

19) ICH S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. January 2015. https://www.fda.gov/media/85076/download

20) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 “Guidance Document On Direct Phototransformation of Chemicals In Water” Environment Directorate, OECD, Paris
21) Oesch, F., Fabian, E., Guth, K., and Landsiedel, R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. Arch Toxicol. 2014; 88(12):2135–2190. doi:10.1007/s00204-014-1382-8
22) Ceridono, M., Tellner, Par, Bauer, D., Barroso, J., Alépée, N., Corvi, R., De Smedt, A., Fellows, M.D., Gibbs, N.K., Heisler, E., Jacobs, A., Jirova, D., Jones, D., Kandárová, H., Kasper, P., Akunda, J.K., Krul, C., Learn, D., Liebsch, M., Lynch, A.M., Muster, W., Nakamura, K., Nash, J.F., Pfannenbecker, U., Phillips, G., Robles, C., Rogiers, V., Van De Water, F., Liminga, U.W., Vohr, H.W., Wattrelos, O., Woods, J., Zuang, V., Kreysa, J., and Wilcox, P. (2012) The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity Testing – The report of an ECVAM-EFPIA workshop. Reg Tox Pharm. 63: 480- 488.
23) Jones, P.A., Lovell, W.W., King, A.V., Earl, L.K (2001) In vitro testing for phototoxic potential using the EpiDermTM 3-D reconstructed human skin model. Toxicology Methods 11, 1–19.

© OCDE (2023)

24) Jones, P.A, King, A.V., Earl, L.K., Lawrence, R.S (2003) An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using in vitro assays. Toxicology in Vitro 17 (2003) 471–480.

25) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H.,Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on in vitrophototoxicity testing: First results obtained with a BALB/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

26) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431): In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. https://doi.org/10.1787/9789264264618-en

27) Liebsch M.(1997). Standard Operation Procedure. EpiDerm™ Phototoxicity Assay (model: Epi-200). Final version. 5 Novemb. 97. 28 p Annex 3 to the Final Report.
Available via https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02

28) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 495): ROS (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. https://doi.org/10.1787/915e00ac-en

29) EMA, (2015). ICH Guidance S10 on Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/752211/2012 Committee for Human Medicinal Products. Available at https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf

30) Líšková, A., Letašiová, S., Jantová, S., Brezová, V., and Kandárová, H. (2020) "Evaluation of phototoxic and cytotoxic potential of TiO2 nanosheets in a 3D reconstructed human skin model", ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 37(3), pp. 441-450. doi: 10.14573/altex.1910012.

31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, J. Immunol. Methods 65, 55- 63.

32) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. (2015) Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Toxic. In vitro. 29(4), 741-761.

33) Kandarova, H and Liebsch, M (2017) 'The EpidermTM Phototoxicity Test (EpidermTM H3D-PT, Chapter 35), C, Eskes., E. van Vliet., H.I., H.I. Maibach (Eds), Alternative for Dermal Toxicity Testing, Springer International Publishing, Page 483 – 503

34) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.

35) Stoien, JD, and Wang, RJ. Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue culture medium by blacklight. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71(10):3961-3965. doi:10.1073/pnas.71.10.3961

36) FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May2001. Available at URL: http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm

© OCDE (2023)

37) Spielmann, H., Blla, M., Dupuis, J., Pape, W.J., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., Brantom, P (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. Toxicology in Vitro 12 (1998) 305 - 327

38) Liebsch M.(1998). Prevalidation of the "EpiDerm™ Phototoxicity Test" - FINAL REPORT (Phases I, II,III). Available via https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02.

© OCDE (2023)

ANNEXE 1 : Définitions

Bandes de longueurs d'onde des ultraviolets : les désignations recommandées par la Commission internationale de l'éclairage (CIE) sont : **UVA** (315-400 nm), **UVB** (280-315 nm) et **UVC** (100-280 nm). D'autres désignations sont également utilisées : la limite entre UVB et UVA est souvent placée à 320 nm, et les UVA peuvent être subdivisés en UV-A1 et UV-A2 avec une limite à environ 340 nm.

CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance.

CLUP : chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance

Coefficient d'absorption molaire (ou coefficient d'extinction molaire) : constante établie dans des conditions spécifiques (véhicule, température, longueur d'onde, notamment) caractérisant, pour toute molécule, l'efficacité avec laquelle cette molécule peut absorber un photon (généralement exprimée en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Concordance : mesure de la performance d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de « précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques soumis à l'essai (20).

Dose d'exposition à la lumière : quantité (**=** intensité × temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules **(=** W × s) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou J/cm^2.

Épreuve : expérience consistant à tester un ou plusieurs produits chimiques d'essai parallèlement à un témoin véhicule (négatif) et à un témoin positif.

Essai substitutif : essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et produits chimiques d'essai possibles (10).

Fiabilité : mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires utilisant le même protocole. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (20).

IATA : Approches intégrées d'essai et d'évaluation.

© OCDE (2023)

Irradiance : intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m^2 ou en mW/cm^2.

Mélange : mélange ou solution composé(e) d'au moins deux substances qui n'interagissent pas entre elles (14).

MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium bleu de thiazolyle.

MTT NS : réduction non spécifique du MTT.

Normes de performance : Normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de précision et de fiabilité, comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (20).

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (20).

Phototoxicité : réaction toxique aiguë survenant après une exposition de la peau à certains produits chimiques puis à la lumière, ou déclenchée par une exposition de la peau à la lumière après administration systémique d'un produit chimique.

Précision : degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de la performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa « pertinence ». Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

Produit chimique : Une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai : ce qui est soumis à l'essai.

Sensibilité : proportion des produits chimiques d'essai positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

Spécificité : proportion des produits chimiques d'essai négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

Témoin négatif (TN) : voir Témoin véhicule (TS).

© OCDE (2023)

Témoin positif (TP) : Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. L'intensité de cette réponse positive ne doit pas être excessive, pour qu'il soit assuré que sa variabilité dans le temps pourra être évaluée.

Témoin véhicule (TS) : Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le véhicule utilisé, mais à l'exception du produit chimique d'essai. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même véhicule ; dans la présente méthode d'essai, il sert de témoin négatif pour l'analyse des données. Il est soumis aux mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins.

Témoin Tmorts NS : témoin de couleur non-spécifique dans les tissus morts.

Témoin Tvivants NS : témoin de couleur non-spécifique dans les tissus vivants.

UVCB : substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

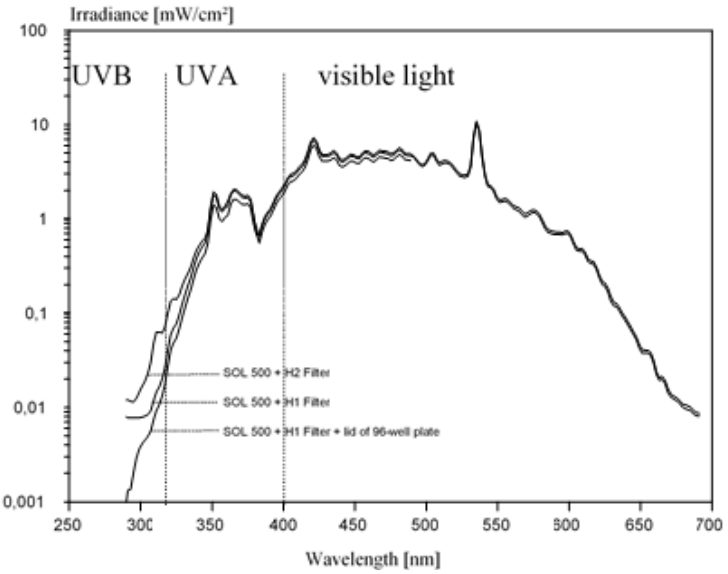
Viabilité cellulaire : paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

Viabilité tissulaire relative : viabilité tissulaire exprimée par rapport à celle des témoins véhicule (négatifs) qui ont été soumis à l'ensemble de la procédure (soit +Irr, soit -Irr), mais non traités avec un produit chimique d'essai.

© OCDE (2023)

ANNEXE 2

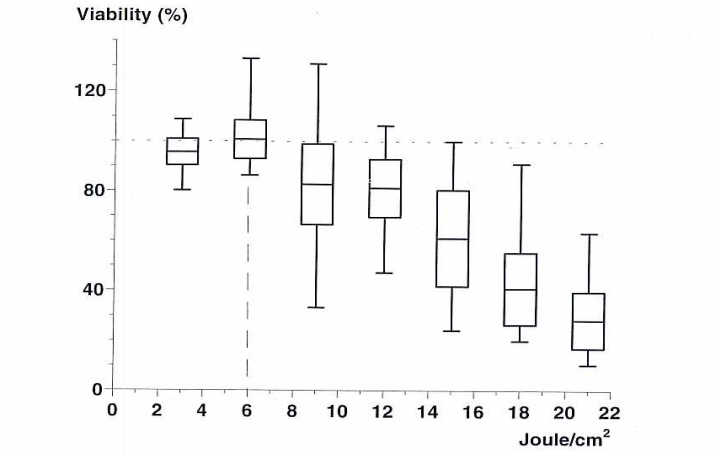
Graphique 1. Puissance du spectre d'un simulateur solaire filtré
Source: Spielmann, H. et al (1998) (37)



Le Graphique 1 donne un exemple de distribution acceptable de la puissance du spectre d'un simulateur solaire filtré. Il a été obtenu avec la source aux halogénures métalliques dopée utilisée dans les essais de validation de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU et de pré-validation de l'essai de phototoxicité EpiDerm ainsi que dans la plupart des études de suivi. On peut y voir l'effet des deux filtres distincts, ainsi que l'effet de filtration du couvercle de la plaque 96 puits. Le filtre H2 a été uniquement utilisé avec les systèmes d'essai capables de supporter une quantité plus importante d'UVB (essai sur modèle de peau et essai de photo-hémolyse des globules rouges). Dans l'essai 3T3 NRU, le filtre H1 a été utilisé. Le graphique montre que l'effet de filtration supplémentaire du couvercle de la plaque est principalement observé dans la plage des UVB, laissant néanmoins suffisamment d'UVB dans le spectre d'exposition pour exciter les produits chimiques qui absorbent généralement la lumière dans ce domaine, tels que l'amiodarone.

© OCDE (2023)

Graphique 2. Sensibilité à l'exposition à la lumière de l'épiderme humain reconstitué (mesurée dans la plage des UVA)
Source: Liebsch et al (1998) (38)



Ce graphique, extrait de Liebsch et al (1999), montre les résultats obtenus avec des tissus exposés à des doses croissantes d'UVA comparé à des tissus non exposés à la lumière. La viabilité relative a été déterminée avec le test du MTT. Chaque boîte à moustaches correspond à la moyenne de 12 tissus évalués au cours de quatre épreuves indépendantes. Les tissus ont toléré une dose de 6 J/cm^2 sans hausse de l'effet cytotoxique. La dose s'élève à 1.7 mW/cm2 (d'u\UVA), avec un temps d'exposition à la lumière de 10 minutes, produisant 1J.

© OCDE (2023)

ANNEXE 3 : Remarques concernant le choix des véhicules des produits chimiques d'essai

Véhicule / Véhicule :

Pendant le développement et l'étude de pré-validation de la méthode (3)(38), il a été décidé d'utiliser l'huile de sésame comme véhicule et véhicule pour les produits chimiques trop peu solubles dans l'eau. Plusieurs autres véhicules ont été testés par les autres laboratoires participant à la pré-validation (Graphique 3), mais le choix s'est porté sur l'huile de sésame pour l'expérience finale. Outre les véhicules à base d'huile, l'éthanol et le mélange acétone:huile d'olive ont été proposés pour les produits peu solubles dans l'eau ou dans l'huile (5)(30).

Il est important de choisir un véhicule laissant passer correctement le spectre complet de lumière simulée, c'est-à-dire n'absorbant pas de manière perceptible les longueurs d'onde présentes dans le spectre de lumière simulée. De plus, on veillera à ne pas dépasser le volume de 50 µL, car un volume excessif de véhicule/véhicule à la surface des tissus peut avoir des propriétés de photo-protection.

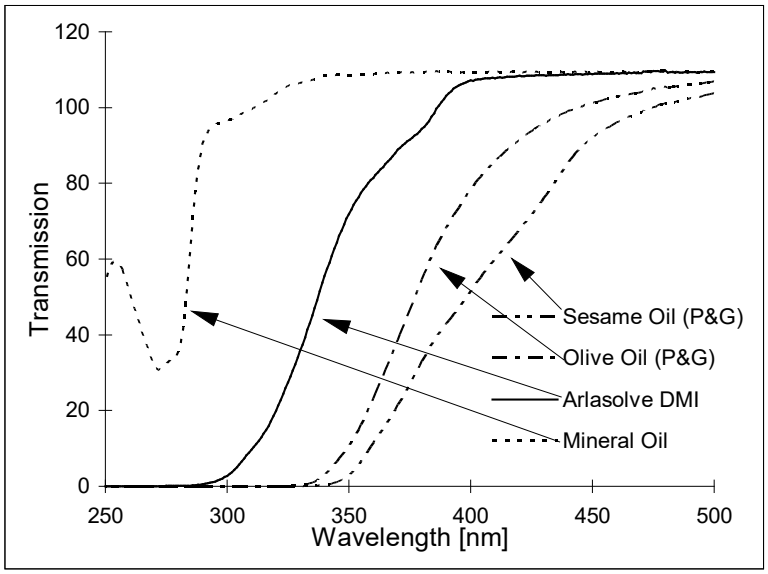
Par ailleurs, la réponse biologique des tissus en 3D au véhicule/véhicule alternatif doit être évaluée. Le véhicule/véhicule alternatif ne devrait pas causer une diminution de la viabilité cellulaire en dessous de 70% par rapport à la viabilité cellulaire des tissus traités avec de l'eau.

Le véhicule/véhicule peut altérer le pouvoir phototoxique des produits chimiques, comme l'ont démontré diverses expériences avec la chlorpromazine dans des solutions à base d'huile ou d'eau (3) ou avec l'anthracène dans des solutions à base d'huile ou d'éthanol (3)(30).

© OCDE (2023)

Graphique 3 : Spectres d'absorption/de transmission de trois huiles et du diméthylisosorbide (DMI) Arlasolve (nº CAS 5306-85-4)

Transmission/Longueur d'onde [nm]
Huile de sésame (P&G), Huile d'olive (P&G), DMI Arlasolve, Huile minérale



Source : Liebsch, M. (1998) (38)

© OCDE (2023)