

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

Essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU

INTRODUCTION

1. La phototoxicité est définie comme un effet toxique à une substance appliquée sur le corps, soit déclenchée ou accentuée (et visible à des niveaux de dose faibles), après une exposition importante à la lumière, soit provoquée par l'irradiation de la peau après administration d'une substance par voie systémique.
2. Le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU permet de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai, induite par l'excitation d'un produit chimique après exposition à la lumière. Cet essai évalue la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit chimique, en présence ou absence de lumière. Les substances identifiées par cet essai sont susceptibles d'être phototoxiques *in vivo* après administration systémique et diffusion dans la peau, ou après application topique.
3. Les définitions utilisées sont données dans l'Annexe 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

4. Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (1)(2)(3)(4). Le point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans la plage de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grothaus-Draper), la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester suivant la Ligne directrice 101 de l'OCDE. Si le coefficient d'extinction/d'absorption molaire est inférieur à $10 \text{ litres} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre à l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (1)(5). Voir également l'Annexe 2.
5. Les résultats de l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU récemment évalué (6)(7)(8)(9) ont été comparés aux effets de phototoxicité aiguë *in vivo* chez les animaux et chez les humains, et l'essai s'est révélé fiable pour la prévision de ces effets. L'essai n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocarcinogénicité, et il ne permet pas non plus d'évaluer le pouvoir phototoxique. Par ailleurs, cet essai n'est pas conçu pour prendre en compte les mécanismes indirects de la phototoxicité, les effets des métabolites de la substance d'essai, ou les effets des mélanges.
6. Alors que l'utilisation de systèmes d'activation métabolique est nécessaire en règle générale pour tous les tests *in vitro* de prédiction du potentiel génotoxique ou cancérogène, dans le cas de la phototoxicologie, on ne dispose jusqu'à présent que de rares exemples de produits chimiques qui nécessitent une transformation métabolique pour agir comme une phototoxine *in vivo* ou *in vitro*. Par

conséquent, il ne paraît pas utile ni scientifiquement fondé de réaliser le présent essai en présence d'un système d'activation métabolique.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

7. Le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'une substance chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique de lumière solaire simulée. Dans cet essai, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red - NR] 24 heures après traitement par le produit chimique mis à l'essai et irradiation (10). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale sensible entraîne une fragilité lysosomale et d'autres modifications qui deviennent graduellement irréversibles. Ces modifications induites par l'action de xénobiotiques entraînent une diminution de la fixation du rouge neutre, sur la base de laquelle on peut distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes ou abîmées.

8. Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 heures jusqu'à formation de monocouches. Pour chaque substance chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 heure avec 8 concentrations distinctes de la substance chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à la dose d'irradiation non cytotoxique la plus élevée, tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité. Dans les deux plaques, le milieu de traitement est ensuite remplacé par un milieu de culture et, après une nouvelle période d'incubation de 24 heures, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake - NRU). La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins de solvant non traités, est calculée pour chaque concentration d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence et en absence d'irradiation sont comparées, généralement au niveau CE₅₀, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 pour cent par rapport aux témoins non traités.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Cellules

9. Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris, Balb/c 3T3, clone 31, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginie, Etats-Unis), ou de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, Royaume-Uni) a été utilisée dans l'étude de validation et il est donc recommandé que les cellules proviennent d'un déposant de cellules bien qualifié. D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi donner de bons résultats avec le même protocole d'essai si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules. Il convient toutefois d'en démontrer l'équivalence.

10. Les cellules doivent être régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si aucun n'est trouvé (11).

11. Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UV des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle qualité décrite dans la présente Ligne directrice. Dans la mesure où la sensibilité aux UVA des cellules peut augmenter avec le nombre de passages, il convient d'utiliser des cellules Balb/c 3T3 ayant subi le moins de passages possibles, de préférence moins de 100 (voir le paragraphe 29 et l'Annexe 3).

Milieus et conditions de culture

12. Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés doivent être utilisés pour le passage systématique des cellules et pendant la procédure d'essai. Par exemple, pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enrichi avec 10 pour cent de sérum de veau nouveau-né, de glutamine (4 mM), de pénicilline (100 IU) et de streptomycine (100 µg/ml), et incubé à 37 °C en atmosphère humidifiée, avec une teneur en CO₂ de 5 à 7,5 pour cent selon le tampon (voir le paragraphe 17). Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales historiques des cellules ou de la lignée cellulaire utilisées.

Préparation des cultures

13. Des cellules provenant de cultures mères congelées sont mises en culture à une densité appropriée dans le milieu de culture, et sont repiquées au moins une fois avant d'être utilisées pour le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU.

14. Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture estensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 heures après la mise en culture des cellules. Pour les cellules Balb/c 3T3 cultivées sur des plaques à 96 puits, la densité cellulaire recommandée est de 1×10^4 cellules par puits.

15. Pour chaque substance chimique testée, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées parallèlement pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+ Irr) et l'autre maintenue à l'obscurité (- Irr).

Préparation de la substance d'essai

16. Les substances chimiques de l'essai doivent être fraîchement préparées, juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'elles sont conservables. Il est recommandé de procéder à la manipulation des substances chimiques et au traitement initial des cellules dans des conditions d'éclairage permettant d'éviter la photoactivation ou la dégradation de la substance d'essai avant irradiation.

17. Les substances chimiques de l'essai doivent être dissoutes dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution - EBSS) ou d'autres solutions tamponnées physiologiquement équilibrées, exemptes de constituants protéiques qui absorbent la lumière (par exemple, indicateurs pH colorés et vitamines), afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation. Sachant que, pendant l'irradiation, les cellules sont maintenues pendant 50 minutes environ en dehors de l'incubateur CO₂, des précautions doivent être prises pour éviter l'alcalinisation. Avec des solutions

faiblement tamponnées, telles que l'EBSS, il convient alors d'incuber les cellules à 7,5 pour cent de CO₂. Si les cellules sont incubées à 5 pour cent de CO₂ seulement, un tampon plus fort doit être utilisé.

18. Les substances chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissoutes dans des solvants appropriés. Si un solvant est utilisé, il doit être présent à un volume constant dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs (solvant) et dans toutes les concentrations de la substance chimique d'essai, et être en outre non cytotoxique à la concentration utilisée. Les concentrations de la substance chimique doivent être sélectionnées de façon à éviter les précipités ou les solutions troubles.

19. Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avant utilisation, notamment les risques de réaction avec la substance chimique d'essai, l'atténuation de l'effet phototoxique, les propriétés de fixation des radicaux, et/ou la stabilité du produit chimique dans le solvant.

20. Si nécessaire, on peut recourir à un mélangeur Vortex et/ou 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 de la substance chimique.

Conditions d'irradiation

21. *Source de lumière* : le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés est le facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et de la lumière visible sont généralement associés à des réactions phototoxiques *in vivo* (3)(12), tandis que les UVB sont moins pertinents, étant très cytotoxiques, avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1000 entre 313 et 280 nm (13). Parmi les critères présidant au choix de la source de lumière appropriée, il est essentiel que la source de lumière émette des longueurs d'onde absorbées par la substance chimique d'essai et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai d'exposition raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photocytotoxiques connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas trop endommager le système d'essai, par exemple par l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

22. La lumière solaire simulée par des simulateurs solaires est considérée comme la source optimale de lumière artificielle. La distribution du pouvoir d'irradiation du simulateur solaire filtré doit être proche de celle de la lumière du jour extérieure donnée dans le document (14). Des arcs au xénon ou des arcs aux halogénures de métal-mercure (dopé) peuvent être utilisés comme simulateurs solaires. Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils reproduisent moins bien la lumière solaire que ceux avec des 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 les longueurs d'onde UVB hautement cytotoxiques. Dans la mesure où les matériaux plastiques utilisés pour les cultures cellulaires contiennent des stabilisateurs UV, le spectre doit être mesuré à travers le même type de plaques à 96 puits 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 (14). Les documents (8)(16) donnent un exemple de distribution de l'irradiance spectrale du simulateur solaire équipé de filtres qui a été utilisé dans l'étude de validation du test *in vitro* 3T3 NRU (voir également la Figure 1 de l'Annexe 3).

23. *Dosimétrie* : l'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque

essai de phototoxicité, à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié. L'intensité doit être mesurée à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Le radiomètre UV doit avoir été étalonné par rapport à la source. Les performances du radiomètre UV doivent être contrôlées. À cet effet, on recommande l'utilisation d'un second radiomètre UV de référence, du même type et étalonné de la même façon. Dans l'idéal, à intervalles plus grands, il conviendrait d'utiliser un spectroradiomètre pour mesurer l'irradiance spectrale de la source de lumière filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande.

24. Une dose de 5 J/centimètre carré (dans la plage des UVA) est non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter les substances chimiques et déclencher des réactions phototoxiques. Par exemple, pour obtenir 5 J/centimètre carré dans un délai de 50 minutes, l'irradiance a été réglée à 1,7 mW/centimètre carré dans l'étude de validation (6)(17). Voir la Figure 2 de l'Annexe 3. En cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la dose d'irradiation en respectant le critère selon lequel cette dose ne doit pas être nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour détecter les phototoxines standard. La durée de l'exposition à la lumière se calcule de la façon suivante :

$$t \text{ (min)} = \frac{\text{dose d'irradiation (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiance (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

Conditions d'essai

Concentrations de la substance d'essai

25. Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+Irr) et en absence (-Irr) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début puis après un délai de 60 minutes (ou à la durée employée dans l'essai), dans la mesure où celle-ci peut varier avec le temps ou au cours de l'exposition. Pour éviter toute toxicité induite par des conditions de culture inappropriées ou des substances chimiques hautement acides ou alcalines, il faut que le pH des cultures cellulaires, auxquelles la substance d'essai a été ajoutée, soit dans une plage comprise entre 6,5 et 7,8.

26. La concentration la plus élevée de la substance d'essai doit être dans les conditions d'essai physiologiques, par exemple le stress pH ou osmotique doit être évité. Selon la substance d'essai, il peut s'avérer nécessaire d'envisager d'autres propriétés physico-chimiques comme facteurs limitant la concentration d'essai la plus élevée. Pour les substances relativement insolubles, mais non toxiques à des concentrations allant jusqu'au point de saturation, il y a lieu de procéder à des essais pour déterminer la concentration la plus élevée qui puisse être atteinte. De manière générale, il y a lieu d'éviter les effets de précipités de la substance chimique à toutes les concentrations d'essai. La concentration maximale d'une substance d'essai ne doit pas dépasser 1000 µg/ml, et l'osmolalité ne doit pas dépasser 10 milliosmoles. Il convient d'utiliser une série de dilutions en progression géométrique comprenant 8 concentrations de la substance d'essai avec un facteur de dilution constant (voir le paragraphe 47).

27. Si les informations provenant d'expériences préalables établissent qu'une substance chimique n'est pas cytotoxique jusqu'à la concentration limite dans l'obscurité (-Irr), mais se révèle hautement cytotoxique exposée à la lumière (+Irr), les plages de concentrations à choisir pour l'expérience (+Irr) peuvent être différentes de celles utilisées pour l'expérience (-Irr), de façon à garantir une qualité adéquate des résultats.

Contrôles / Témoins

28. *Sensibilité des cellules aux radiations, données historiques* : la sensibilité des cellules à la source lumineuse doit être régulièrement contrôlée (tous les cinq passages environ), par évaluation de leur viabilité après une exposition à des doses croissantes d'irradiation. Pour cette évaluation, plusieurs doses d'irradiation doivent être utilisées, y compris des niveaux significativement supérieurs à ceux de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU. La méthode la plus simple pour quantifier ces doses consiste à mesurer les UV à la source. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. Elles sont irradiées le jour suivant, et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Il faut alors que la dose non cytotoxique la plus élevée (par exemple, 5 J/cm² [UVA] dans l'étude de validation) soit suffisante pour classer correctement les substances de référence (Tableau 1).

29. *Sensibilité aux radiations, contrôle de l'essai en cours* : l'essai répond aux critères de qualité si les témoins de contrôle négatifs (solvant) irradiés ont une viabilité supérieure ou égale à 80 pour cent de celle des témoins de contrôle négatifs non irradiés.

30. *Viabilité des témoins de solvant* : la densité optique absolue (OD_{540 NRU}), mesurée dans l'extrait NR des témoins de solvant indique si les 1×10^4 cellules mises en culture par puits se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours de l'essai. Un essai répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne OD_{540 NRU} des témoins non traités est $\geq 0,4$ (c'est-à-dire approximativement vingt fois l'absorbance de fond du solvant).

31. *Témoin positif* : pour chaque essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurremment. La chlorpromazine (CPZ) est recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis : CPZ irradiée (+Irr) : CE₅₀ = 0,1 à 2,0 µg/ml, CPZ non irradiée (-Irr) : CE₅₀ = 7,0 à 90,0 µg/ml. Le facteur de photo-irritation (PIF) doit être > 6 . Les données historiques du témoin positif doivent être suivies.

32. À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité de la substance chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles.

Mode opératoire (6)(7)(8)(16)(17) :**Premier jour :**

33. Verser 100 µl de milieu de culture dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage de culture de tissu à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 µl d'une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml en milieu de culture, (= 1×10^4 cellules/puits). Préparer deux plaques pour chaque série des concentrations de la substance à tester, ainsi que pour les témoins négatifs (de solvant) et positifs.

34. Incuber les cellules pendant 24 heures (voir le paragraphe 12) jusqu'à formation d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

Deuxième jour :

35. Après incubation, décanter le milieu de culture pour le séparer des cellules et laver délicatement avec 150 µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation. Ajouter 100 µl de la solution tamponnée contenant la concentration appropriée de la substance chimique à tester, ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes de la substance chimique à tester. Incuber les cellules avec la substance chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (voir les paragraphes 12 et 17).

36. Sur les deux plaques préparées pour chaque série de concentrations, ainsi que pour les témoins, une plaque est sélectionnée, généralement au hasard, pour la détermination de la cytotoxicité (-Irr) (par exemple, la plaque témoin), et l'autre (la plaque de traitement) pour la détermination de la photocytoxicité (+Irr).

37. Pour réaliser la partie (+Irr) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes environ à travers le couvercle de la plaque à 96 puits, à la dose maximale de radiations non cytotoxique (voir également l'Annexe 3). Conserver les plaques identiques non irradiées (-Irr) à température ambiante dans une boîte obscure pendant 50 minutes (= durée de l'exposition à la lumière).

38. Décanter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation, mais ne contenant pas la substance d'essai. Remplacer le tampon par le milieu de culture et incuber (voir le paragraphe 12) jusqu'au lendemain (18-22 heures).

Troisième jour :*Évaluation microscopique*

39. Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter la croissance, la morphologie et l'intégrité de la monocouche. Les changements morphologiques et les effets sur la croissance cellulaire doivent être enregistrés.

Test de fixation du rouge neutre

40. Laver les cellules avec 150 µl de la solution tamponnée préchauffée. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 µl de milieu sans sérum à 50 µg/mL de NR (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine hydrochloride, numéro CAS 553-24-2 ; C.I. 50040) (16) et incuber selon la procédure décrite au paragraphe 12, pendant 3 heures.

41. Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 µl du tampon. Décanter et évacuer complètement le tampon en excès par absorption ou centrifugation.

42. Ajouter exactement 150 µl de solution de désorption NR (solution fraîchement préparée de 49 parts d'eau + 50 parts d'éthanol + 1 part d'acide acétique).

43. Passer rapidement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes, jusqu'à ce que le NR soit extrait des cellules et forme une solution homogène.

44. Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540 nm dans un spectrophotomètre en utilisant les essais à blanc comme référence. Sauvegarder les données dans un format de fichier électronique approprié en vue d'une analyse ultérieure.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Qualité et quantité des données**

45. Les données d'essai doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-effet obtenues avec et sans irradiation, et si possible de la concentration de la substance d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de moitié (CE_{50}). Si on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster à la fois la gamme des concentrations et l'intervalle entre chaque concentration, afin qu'il y ait concordance entre la courbe et les données expérimentales.

46. Pour les résultats clairement positifs ou clairement négatifs (voir le paragraphe 53), l'expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des gammes de concentrations, est généralement suffisante.

47. Les tests qui donnent des résultats équivoques, limites ou non clairs, doivent être vérifiés par un essai supplémentaire (voir également le paragraphe 56). Si cet essai s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales, et notamment la plage ou l'espacement des concentrations, le temps de préincubation, et le temps d'exposition à l'irradiation. Une réduction de cette durée d'exposition peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

Évaluation des résultats

48. Pour procéder à l'évaluation des données, il peut être nécessaire de calculer un facteur de photo-irritation (PIF) ou un photo-effet moyen (MPE).

49. Pour le calcul des mesures de photocytotoxicité (voir ci-après), l'ensemble des valeurs discrètes de concentration-effet doit être déterminé par une courbe dose-effet continue appropriée (modèle). On fait généralement concorder la courbe aux données en appliquant une méthode de régression non linéaire (18). Pour évaluer l'influence de la variabilité des données sur la courbe ajustée, il est recommandé d'employer une procédure de type « bootstrap ».

50. On calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

S'il n'est pas possible de calculer une CE_{50} , tant en présence (+Irr) qu'en absence (-Irr) de lumière, cela signifie qu'aucun PIF ne peut être déterminé pour la substance d'essai.

51. Le photo-effet moyen (MPE) est une mesure basée sur une comparaison des courbes de concentration-effet complètes (19). Il correspond à la moyenne pondérée d'un ensemble représentatif de valeurs du photo-effet :

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Le photo-effet (PE_c) à n'importe quelle concentration (C) est défini comme étant le produit de la réponse-effet (RE_c) et de dose-effet (DE_c), soit $PE_c = RE_c \times DE_c$. La réponse-effet (RE_c) correspond à la différence entre les réponses observées en absence et en présence de lumière, soit $RE_c = R_c (-Irr) - R_c (+Irr)$. La dose-effet est donnée par la formule suivante :

$$DE_c = \frac{|C/C^* - 1|}{|C/C^* + 1|}$$

où C^* représente la concentration équivalence, c'est-à-dire la concentration à laquelle la réponse +Irr est équivalente à la réponse -Irr à la concentration C . S'il n'est pas possible de déterminer C^* parce que les valeurs de la courbe +Irr sont systématiquement supérieures ou inférieures à $R_c (-Irr)$, la dose-effet est fixée à 1. Les facteurs de pondération w_i sont donnés par la valeur la plus élevée, soit $w_i = \text{MAX} \{R_i (+Irr), R_i (-Irr)\}$. La grille de concentration C_i est choisie de façon à ce que le même nombre de points figure dans chaque intervalle de concentration défini par les valeurs de concentration utilisées dans l'expérience. Le calcul du MPE est limité par la valeur de concentration maximale à laquelle au moins une des deux courbes montre une valeur de réponse d'au moins 10 pour cent. Si cette concentration maximale est supérieure à la concentration la plus élevée utilisée dans l'expérience +Irr, la partie résiduelle de la courbe +Irr est mise à la valeur de réponse « 0 ». La substance chimique est ensuite classée ou non comme étant phototoxique, selon que la valeur MPE est supérieure ou non à une valeur de seuil correctement choisie ($MPE_c = 0,15$).

52. Un logiciel de calcul des PIF et MPE est disponible auprès du Secrétariat (20).

Interprétation des résultats

53. Sur la base de l'étude de validation (8), une substance d'essai dont le PIF est < 2 ou le MPE $< 0,1$ ne présente « aucune phototoxicité ». Un PIF > 2 et < 5 ou un MPE $> 0,1$ et $< 0,15$ indique une « phototoxicité probable » et un PIF > 5 ou un MPE $> 0,15$ indique une « phototoxicité ».

54. Pour les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois, il est préconisé de procéder à un essai sur les substances de référence données dans le Tableau 1, avant d'entreprendre l'évaluation phototoxique de substances d'essai. Les valeurs PIF ou MPE doivent être proches des valeurs données dans le Tableau 1.

TABLEAU 1

N° chimique et CAS	PIF	MPE	Pic d'absorption	Solvant ¹
Amiodarone chlorhydrate [19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (épaule)	éthanol
Chlorpromazine chlorhydrate [69-09-0]	>14,4	0,33-0,63	309 nm	éthanol
Norfloxacin [70458-96-7]	>71,6	0,34-0,90	316 nm	acétonitrile
Anthracène [120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acétonitrile
Protoporphyrine IX, Disodium [50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	éthanol
L – Histidine [7006-35-1]	pas de PIF	0,05-0,10	211 nm	eau
Hexachlorophène [70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (épaule)	éthanol
Dodécyl sulfate de sodium [151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	Pas d'absorption	eau

Interprétation des résultats

55. Si des effets phototoxiques ne sont observés qu'à la concentration d'essai maximale (en particulier pour les substances d'essai solubles dans l'eau), d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques. Il peut s'agir notamment d'étudier l'absorption cutanées et l'accumulation du produit chimique dans la peau, et/ou de soumettre le produit à un autre type d'essai, en recourant par exemple à des essais *in vitro* sur peau humaine ou animale, ou un modèle de peau.

56. En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+Irr et -Irr) et si la solubilité faible du produit dans l'eau a limité les concentrations d'essai, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un essai de confirmation avec un autre modèle.

Rapport d'essai

57. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Substance d'essai :

- données d'identification, nom générique commun et numéros IUPAC et CAS si connus ;
- nature physique et pureté ;
- propriétés physico-chimiques importantes pour la réalisation de l'étude ;
- spectre d'absorption UV/lumière visible ;
- stabilité et photostabilité si connues.

¹ Solvant utilisé pour mesurer l'absorption.

Cellules :

- type et provenance des cellules ;
- absence de mycoplasmes ;
- nombre de passages cellulaires, si connu ;
- sensibilité des cellules aux radiations, déterminée avec l'appareil d'irradiation utilisé dans l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU.

Conditions expérimentales (1) ; *incubation avant et après traitement* :

- type et composition du milieu de culture ;
- conditions d'incubation (concentration de CO₂, température, humidité) ;
- durée de l'incubation (avant traitement et après traitement).

Conditions expérimentales (2) ; *traitement par la substance chimique* :

- justification du choix des concentrations de la substance chimique utilisées en présence et en absence de rayonnement ;
- en cas de solubilité limitée du produit chimique et d'absence de cytotoxicité, justification de la concentration maximale utilisée ;
- type et composition du milieu de traitement (solution saline tamponnée) ;
- durée du traitement chimique.

Conditions expérimentales (3) ; *irradiation* :

- justification de la source de lumière utilisée ;
- fabricant et type de source de lumière et de radiomètre ;
- caractéristiques d'irradiance spectrale de la source de lumière ;
- caractéristiques de transmission/absorption du (des) filtre(s) utilisé(s) ;
- 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/cm² ;
- durée de l'exposition UV/lumière visible ;
- dose d'UVA (irradiance × temps), exprimée en J/cm² ;
- température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité.

Conditions expérimentales (4) ; *test NRU* :

- composition du milieu de traitement NR ;
- durée de l'incubation dans NR ;
- conditions d'incubation (concentration de CO₂, température, humidité) ;
- conditions d'extraction du NR (agent d'extraction, durée) ;
- longueur d'ondes utilisée pour la lecture spectrophotométrique de la densité optique du NR ;
- seconde longueur d'ondes (référence), le cas échéant ;
- contenu de l'échantillon destiné à l'essai à blanc du spectrophotomètre, le cas échéant.

Résultats :

- viabilité cellulaire obtenue pour chaque concentration de la substance chimique à tester,

- exprimée en pour cent de la viabilité moyenne des témoins de solvant ;
- courbes de concentration (concentration de la substance chimique - viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +Irr et -Irr parallèles ;
 - analyse des courbes concentration: si possible, calcul/détermination des CE₅₀ (+Irr) et CE₅₀ (-Irr) ;
 - comparaison des deux courbes concentration-effet obtenues en présence et en absence de rayonnement, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE) ;
 - critères d'acceptation de l'essai , témoin négatif (solvant) simultané ;
 - viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées ;
 - données historiques sur les témoins négatif et de solvant, moyennes et écarts types.
 - critères d'acceptation de l'essai , témoin positif simultané ;
 - CE₅₀ (+Irr) et CE₅₀ (-Irr) et PIF/MPE du produit chimique témoin positif ;
 - données historiques sur le produit chimique témoin positif: CE₅₀ (+Irr) et CE₅₀ (-Irr) et PIF/MPE, moyennes et écarts types.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In vitro 7: 95-102.
- (2) Santamaria, L. et 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.
- (3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., et Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.
- (4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.
- (5) OCDE (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Direction de l'Environnement, OCDE, Paris
- (6) 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., et Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In vitro 8, 793-796.
- (7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for

- phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM et DGXI/E/2, 3 novembre 1997, ATLA, 26, 7-8.
- (8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., 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., et 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. *Toxic. In vitro* 12, 305-327.
- (9) OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th – 31st October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, disponible sur demande auprès du Secrétariat
- (10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
- (11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225-237.
- (12) Lambert L.A, Wamer W.G., et Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.
- (13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
- (14) ISO 10977. (1993). Photographie -- Films et papiers photographiques couleur traités -- Méthodes de mesure de la stabilité de l'image.
- (15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
- (16) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pages.
- (17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.
- (18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
- (19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.
- (20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Irradiance : l'intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m^2 ou en $mW/\text{centimètre carré}$.

Dose de lumière : la quantité (= intensité \times temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= $W \times s$) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou $J/\text{centimètre carré}$.

Bandes de longueurs d'ondes de la lumière UV : les désignations recommandées par la CIE (Commission internationale de l'éclairage) 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.

Viabilité cellulaire : le paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, absorption du colorant vital rouge neutre dans les lysosomes cellulaires), qui, en fonction de l'effet mesuré et du type de test utilisé, correspond au nombre total et/ou à la vitalité des cellules.

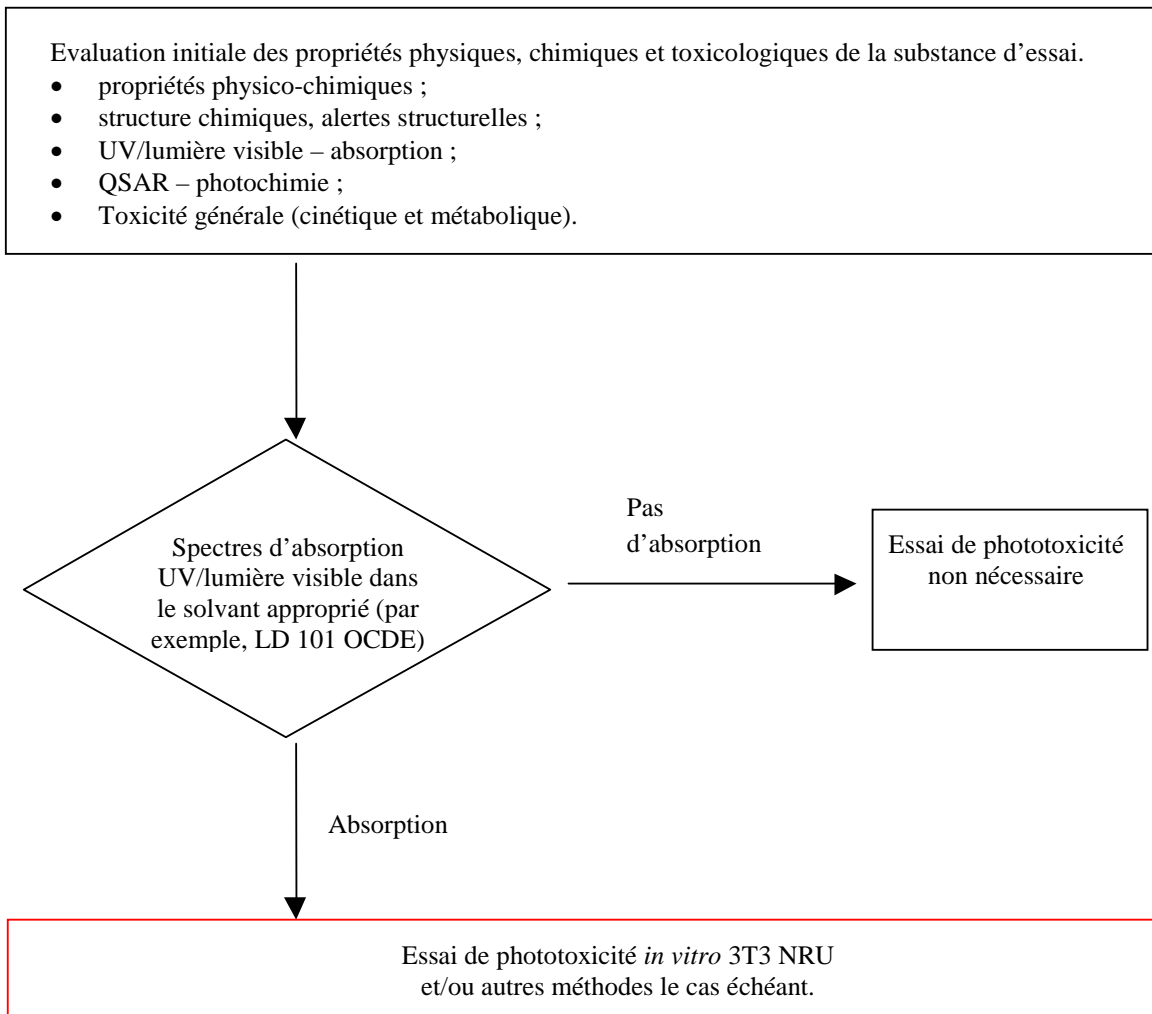
Viabilité cellulaire relative : la viabilité cellulaire exprimée par rapport aux témoins négatifs (solvant) qui ont été prélevés tout ou long de la procédure (soit +Irr soit -Irr), mais non traités par un produit chimique.

PIF (Photo Irritation Factor - Facteur de photo-irritation) : le facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (CE_{50}) de la substance chimique d'essai, obtenues en absence (-Irr) ou en présence (+Irr) d'une irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

CE_{50} : concentration de la substance chimique d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 50 pour cent.

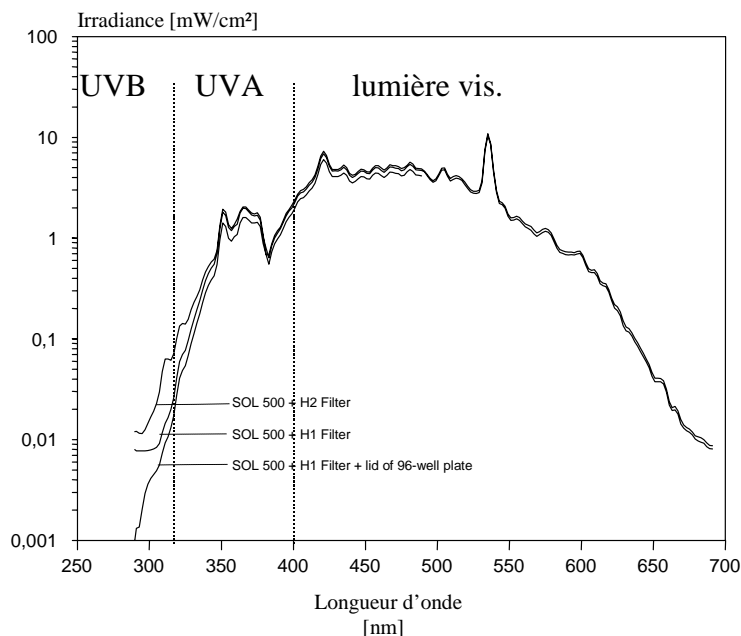
MPE (Mean Photo Effect - Photo-effet moyen) : mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé de deux courbes concentration-effet obtenues avec (+Irr) ou sans (-Irr) irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

Phototoxicité : réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit chimique.

ANNEXE 2Rôle de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU
dans une approche séquentielle d'essai des substances chimiques

ANNEXE 3

Figure 1: Puissance du spectre d'un simulateur solaire filtré

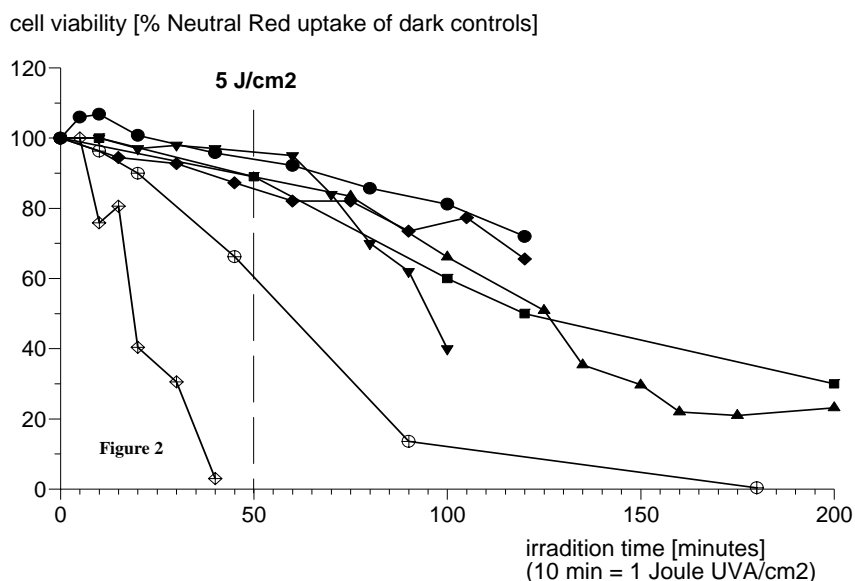


(voir le paragraphe 22)

La Figure 1 donne un exemple de distribution acceptable de la puissance du spectre d'un simulateur solaire filtré. C'est celui de la source aux halogénures de métaux dopée utilisée dans l'essai de validation du test 3T3 NRU (6)(8)(17). Cette figure fait apparaître l'effet des deux filtres distincts, ainsi que l'effet de filtration de la plaque à 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. La figure montre que l'effet de filtration supplémentaire de la plaque est principalement observé dans la plage des UVB, laissant néanmoins suffisamment d'UVB dans le spectre d'irradiation pour exciter les substances chimiques qui absorbent généralement la lumière dans la plage des UVB, telles que l'Amiodarone chlorhydrate (voir le Tableau 1).

Figure 2

Irradiation sensitivity of Balb/c 3T3 cells (as measured in the UVA range)



(voir les paragraphes 24, 28, 29)

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation avec le simulateur solaire utilisé dans l'essai de validation du test de phototoxicité 3T3 NRU, mesurée dans la plage des UVA. La figure montre les résultats obtenus dans sept laboratoires différents au cours de l'étude de pré-validation (1). Les deux courbes avec des symboles transparents ont été obtenues avec des cellules âgées (nombre de passages élevés), qu'il a fallu remplacer par de nouvelles cellules, tandis les courbes aux symboles pleins sont associées à des cellules montrant une tolérance acceptable à l'irradiation.

C'est à partir de ces données qu'on a dérivé la dose maximale d'irradiation non cytotoxique de 5 J/cm² (ligne discontinue verticale). La ligne de pointillés horizontale montre en outre l'effet maximal d'irradiation acceptable (paragraphe 29).